

**DIE BEDEUTUNG PARTIELLER 21-HYDROXYLASE- UND
3 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASEDEFIZIENZEN
FÜR DIE ÄTIOPATHOGENESE VON
FERTILITÄTSSTÖRUNGEN**

D I S S E R T A T I O N
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN
GRADES

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biologisches Institut der Humboldt-Universität zu Berlin

Diplombiologin Zahra Ghanaati
geboren am 19.9.1967 in Shiraz/Iran

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Bernhard Ronacher

1. Gutachter: Prof. Dr. Regine Witkowski
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. Günter Dörner
3. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Börner

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2001

1	Einleitung	1
1.1	Das Adrenogenitale Syndrom (AGS)	2
1.1.1	Historisches über AGS	2
1.1.2	Klinische Formen des AGS	2
1.1.3	Diagnostik des AGS	3
1.1.4	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD)-Defizienz	4
1.1.5	Hormonanalytischer Nachweis der 3 β -HSD-Defizienz	5
1.1.6	Häufigkeit und Vorkommen des AGS	5
1.2	Das Polyzystische Ovar-Syndrom (PCOS)	6
1.2.1	Definition und klinische Symptome des PCOS	6
1.2.2	Häufigkeit des PCOS	8
1.2.3	Ursachen und Diagnostik des PCOS	8
1.2.4	Hormonbefunde bei PCOS	10
1.3	Idiopathische Oligospermie	10
1.3.1	Allgemeines über Fertilitätsstörungen des Mannes	10
1.3.2	Idiopathische Oligospermie und Enzym-Defizienzen	11
1.4	Aufgabenstellung	13
2	Stichprobenauswahl und Methodik	14
2.1	Die Patientenkollektive	14
2.2	Molekulargenetische Untersuchung	15
2.2.1	Vorbemerkung	15
2.2.2	Mutationsanalyse in <i>CYP21</i>	15
2.2.3	Verfahrensschritte	16
1.3	Fluoreszenz -In Situ- Hybridisierung (FISH) und Chromosomenuntersuchung	23
1.4	Hormonanalytische Untersuchungen	23
1.4.1	Vorbemerkung:	23
1.4.2	21-OH-Defizienz	23
1.1.3	3 β HSD-Defizienz	24
1.1.4	Statistische Auswertung der Ergebnisse der Hormonanalysen	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Mutationen bei den Patienten mit AGS	26
3.2	Ergebnisse der Untersuchungen bei der PCOS-Stichprobe	31
3.2.1	Molekulargenetische Befunde	31
3.2.2	Hormonanalysen	31
3.3	Konventionelle Chromosomenanalysen und FISH- Analyse bei der PCOS-Stichprobe	36
3.4	Idiopathische Oligospermie	37
3.4.1	Mutationsanalyse	37
3.4.2	Hormonanalytische Untersuchungen der Stichprobe idiopathische Oligospermie	38
3.5	Vergleiche der molekulargenetischen und hormonanalytischen Befunde	40
4	Diskussion	41
4.1	Überblick	41
4.2	Stellungnahme zur Auswahl hormonanalytischer Methoden	41
4.3	Stellungnahme zur Auswahl molekulargenetischer Methoden	42
4.4	Mutationen im Bereich <i>CYP21</i>	44
4.4.1	Rekombinationen	44
4.4.2	Genkonversionen	44
4.4.3	Hybridgene	44
4.4.4	Punktmutationen	44
4.4.5	Die Charakterisierung der gefundenen Mutationen in <i>CYP21</i> in ihrer Häufigkeit	46
4.4.6	Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei AGS	47
4.4.7	Mögliche Erklärungen für die phänotypische Variabilität beim AGS	49
4.5	Diskussion der PCOS-Befunde	50
4.5.1	Adrenale Enzymdefizienzen bei PCOS	50
4.5.2	Interpretation der Molekulargenetik	51
4.6	Diskussion der Befunde bei idiopathischer Oligospermie	51
5	Zusammenfassung	53
6	Literaturverzeichnis	55

7	Anhang: Materialien	66
8	Danksagung	70
9	Erklärung	70

Abkürzungsverzeichnis

A	Androstendion
Abb	Abbildung
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ACTH-Test	Kortikotropinkurztest
AGS	Adrenogenitales Syndrom
ASO	Allelespezifische Oligonukleotid-Hybridisierung
bp	Basenpaare
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumine
CAH	Congenital Adrenal Hyperplasia
cen	Centromer
CISS	Chromosomal In Situ Suppression
CRH	Kortikotropin-Releasing-Hormon
CYP	Cytochrom P
CYP21	für 21-Hydroxylase kodierendes Gen
CYP21P	Pseudogen von CYP21
C4A und C4B	für die C4-Komplemente kodierende Gene
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS _b	Dehydroepiandrosteronsulfat (basal)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridinphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Kortisol
F _b	Kortisol (basal)
F _T	Kortisol, 1 Stunde nach ACTH-Injektion
FISH	Fluoreszenz-In Situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HLA	Human Lymphocyte Antigen
IO	Idiopathische Oligospermie
ISH	In Situ-Hybridisierung
Ile	Isoleucin
i.v.	Intravenös
kb	Kilobasenpaare
Leu	Leucin
LH	Luteinisierungshormon, Gonadotropin
LHRH	Luteinisierungshormon- Releasing Hormone
LO	Late Onset
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NNR	Nebennierenrinde
OD	Optische Dichte
OHSS	Ovariellies Hyperstimulationssyndrom
opDDD	ortho-para-Dichloro-Diphenyl-Dichloräthan
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCOS	Polycystic Ovary Syndrome (Syndrom des PolyzystischenOvar)
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat (Sodium Dodecyl Sulfat)
SHBG	Steroidhormonbindendes Globulin
ssDNA	Einzelsträngige denaturierte DNA (Single Strand DNA)
SINE	Short Interspersed Repetitive Element
SSC	Natriumsalz-Citrat (Sodium Salt Citrate)
SVS	Salzverlust-Syndrom
SV	Einfach virilisierende Form des AGS (Simple Virilizing)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE	Tris/EDTA
T	Testosteron
TNF α	Cachektin
TNF β	Luphotoxin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen
YAC	Yeast Artificial Chromosome
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase
11-DOF	11-Desoxykortisol
17 α -OH	17 α -Hydroxylase
17 α -OHP	17 α -Hydroxyprogesteron
21-DOF	21-Desoxykortisol
21-OH	21-Hydroxylase

Einleitung

Neuere Methoden der Molekularbiologie haben wesentlich zum Verständnis der Pathophysiologie genetisch bedingter endokriner Erkrankungen beigetragen. Mutationen in Genen, die an Synthese, Sekretion und Transport von Hormonen oder deren Signalübertragung beteiligt sind, können mit der nukleären oder mitochondrialen DNA vererbt werden. Um die molekularen Grundlagen von genetisch bedingten Krankheiten zu verstehen, ist es wünschenswert, alle Einzelheiten über die Gene zu kennen: chromosomale Lokalisation, Sequenz, Regulation der Genexpression und Funktionsweise des Produktes, für das ein bestimmtes Gen den Bauplan darstellt. Von diesem umfassenden Wissen sind wir jedoch noch sehr weit entfernt. Für die meisten Erkrankungen wird auch weiterhin die Diagnose aus dem Phänotyp abgeleitet. Der zugrunde liegende molekulare Defekt muß noch entdeckt werden. Bei den Krankheiten, bei denen der molekulargenetische Mechanismus aufgeklärt ist, ist eine molekulare Diagnostik nutzbringend einsetzbar. So sind zum Beispiel der verursachende molekulargenetische Defekt und die Pathogenese des Adrenogenitalen Syndroms (AGS) weitestgehend aufgeklärt (Labhart, 1978, New et al. 1984, Young et al. 1994, Ventz et al. 1995).

Zahlreiche Veröffentlichungen weisen außerdem auf Zusammenhänge zwischen Fertilitätsstörungen und Enzymdefekten der Steroidbiosynthese hin (Prader et al. 1962, Prader 1958, Zachmann & Prader 1978, Bonaccorsi et al. 1978, Ojeifo et al. 1984, Frank-Raue et al. 1989, Gebert & Thomas, 1992, Reinwein & Benker, 1992). Dabei finden heterozygote Anlagenträger bisher scheinbar nur wenig Beachtung (Milewicz & Medras, 1987), da sie phänotypisch gering oder gar nicht in Erscheinung treten. Die entsprechende Definition nach Pschyrembel (1990) ist jedoch in der heutigen Praxis nicht mehr in dieser absoluten Form gültig, da Heterozygote je nach Expressivität des mutierten Gens Symptome der genetischen Störung in stark abgeschwächter bzw. subklinischer Form zeigen.

Um schwache Ausprägungen heterozygot angelegter Defekte erfassen zu können, muß man sich entsprechender Hilfsmittel bedienen. Ihre biochemische Nachweisbarkeit läßt sich meist nur durch Substratbelastung oder anderweitige Anregung des betroffenen Stoffwechselweges erreichen. Im Falle einiger partieller Steroidhormon-Synthesestörungen stellt die Bestimmung verschiedener Hormonkonzentrationen nach ACTH-Stimulation der Nebennierenrinde eine geeignete Methode dar (Labhart 1978, New & Levine 1984, Levine et al. 1988, Young et al. 1994).

Dörner et al. (1995), postulierten einen Zusammenhang von partiellen Defizienzen der Enzyme 21-Hydroxylase (21-OH) und 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 β -HSD) mit verschiedenen Formen von Fertilitätsstörungen wie z.B. dem Syndrom des Polyzystischen Ovar (Polycystic Ovary Syndrome, PCOS) bei Frauen und der idiopathischen Oligospermie (IO) bei Männern.

Zum besseren Verständnis dieser Zusammenhänge werden im Rahmen dieser Arbeit alle in Frage kommenden Fertilitätsstörungen zunächst genauer beschrieben.

Da Defekte der beiden o.g. Enzyme als Ursache für verschiedene Formen des AGS bekannt sind, wird auch das AGS in die folgende Beschreibung einbezogen.

- **Das Adrenogenitale Syndrom (AGS)**

- Historisches über AGS

Die erste dokumentierte Beschreibung eines AGS stammt aus dem Jahr 1865. Der aus Neapel stammende Anatom DeCrecchio beschrieb eine Leiche, die keine äußerlich palpablen Gonaden, jedoch einen Penis mit hochgradiger Hypospadie hatte. Bei der Autopsie wurden Vagina, Uterus, Tuben, Ovarien und auffallend vergrößerte Nebennieren festgestellt. Zu Lebzeiten verhielt sich die beschriebene Person sexuell und sozial männlich. Sie wurde bei Geburt zum Mädchen und vier Jahre später zum Jungen erklärt (DeCrecchio et al. 1865).

Schon im Jahr 1865 wurde die Bedeutung der Nebenniere durch bilaterale Adrenoektomie bei Tieren von Brown-Sequard (Medvei et al. 1982) erkannt, bis zur Isolierung und Charakterisierung der Nebennierensteroiden dauerte es aber noch ein Jahrhundert.

Die dem AGS zugrunde liegenden biochemischen Defekte wurden fast 90 Jahre nach der Erstbeschreibung durch Identifizierung der Stoffwechselprodukte charakterisiert. Nachdem His schon 1893 den Hypothalamus als das den Nebennierenrinden übergeordnete Steuerzentrum erkannte (Labhardt et al. 1986) und nachdem Li und Mitarbeiter 1943 das bovine ACTH isolierten, folgten Untersuchungen der Regulationsmechanismen der Nebennierensteroidsekretion unter anderem durch Ganong und Mulrow in den Jahren 1962-63 (Mulrow et al. 1962, Medvei et al. 1982) an nephrektomierten und hypophysektomierten Hunden. Bongiovanni et al. (1958) zeigten, daß das AGS durch einen angeborenen 21-OH-Mangel hervorgerufen wird.

- Klinische Formen des AGS

- Die klassische Form des AGS

Als AGS werden autosomal-rezessive vererbte Störungen der Glukokortikoid- und Mineralokortikoidbiosynthese der Nebennierenrinde (NNR) zusammengefaßt, die zu einer Überproduktion von androgenen Nebennierensteroiden führen. Als Synonyme für 21-OH werden auch P-450 (C21), EC 1. 14.99.10 und Steroid 21-Monooxygenase verwendet. Man unterscheidet das klassische AGS, zu dem das SVS- und die SV-Form gehören, von der nicht klassischen Form (late onset).

Der 21-OH-Mangel (Abb.1) hat infolge gehemmter F-Synthese über einen hypophysären Feedback-Mechanismus einen exzessiven Anstieg des ACTH zur Folge. Daraus entsteht eine erhöhte Sekretion von Androgenen aus der NNR, begleitet von einer NNR-Hyperplasie.

Als klassisch werden Fälle bezeichnet, bei denen infolge homozygoter oder compound-heterozygoter Mutationen das fetale Sexualhormonmilieu so stark beeinflusst ist, daß die pränatale Ausbildung der äußeren Geschlechtsmerkmale bei weiblichen Neugeborenen intersexuell verläuft, was als Pseudohermaphroditismus femininus bezeichnet wird. Bei von AGS betroffenen Knaben führt die Hyperandrogenämie zu einer Makrogenitosomie, hohem Geburtsgewicht, zu verringerten Körpergrößen und Pubertas praecox.

In etwa drei Viertel der Fälle eines klassischen 21-OH-Mangels wird ein SVS beobachtet. Infolge weitgehender Insuffizienz der Gluko- und Mineralokortikoidbildung kommt es zu erhöhter Natriumausscheidung und Kaliumretention, was unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tode führen kann. Zur Behandlung werden bei erkanntem klassischen AGS seit 1951 Gluko- und gegebenenfalls Mineralokortikoide lebenslang substituiert.

Etwa ein Viertel der Fälle eines 21-OH-Mangels verlaufen in weniger schweren Formen. Da die NNR unter Normalbedingungen hundertmal mehr Glukokortikoide als Mineralokortikoide synthetisiert, wird bei nicht vollständigem Verlust der 21-OH-Aktivität die Synthese der Mineralokortikoide weniger stark beeinflusst als die Glukokortikoidsynthese. Patienten mit dieser milderen Form des AGS weisen eine deutlich erhöhte Plasma-Renin-Aktivität als Ausdruck einer übermäßigen Stimulation der Mineralokortikoidbiosynthese auf.

- Die nicht-klassische Form des AGS

Die spätmanifeste Form (late onset) des 21-OH-Mangels wurde zum erstenmal 1954 von Gynäkologen postuliert, die Frauen mit Hyperandrogenismus und Infertilität erfolgreich mit Glukokortikoiden behandelten (Jeferies et al. 1958, Jones et al. 1954).

Zunächst wurde angenommen, daß es sich bei den Patientinnen mit dieser milderen Form des 21-OH-Mangels um sogenannte „exprimierende Heterozygote“ für den schweren Defekt handelt (Lee et al. 1975, Zachmann et al. 1978). Durch Familienstudien des klassischen 21-OH-Mangels, in denen der autosomal rezessive Erbgang gezeigt werden konnte, erkannte man die Eigenständigkeit der nicht-klassischen Form des Enzymmangels (Kohn et al. 1982, Levine et al. 1985, Rosenwaks et al. 1979). Auch spätere HLA-Kopplungsanalysen verdeutlichten die weitgehende Unabhängigkeit beider Krankheitsformen. Sie sind mit verschiedenen HLA-Haplotypen in Abhängigkeit von der ethnischen Herkunft assoziiert (Blankstein et al. 1980, Laron et al. 1980, Laron et al. 1985, Speiser et al. 1985). Durch molekulargenetische Studien konnte die nicht-klassische Form des AGS von der klassischen Form auch auf molekularer Ebene abgegrenzt werden (Boehm et al. 1986, Hoeller et al. 1985).

Die klinischen Symptome des nicht-klassischen AGS sind in erster Linie Beschleunigung des Körperwachstums, der Knochenreifung, später Minderwuchs durch vorzeitigen Epiphysenfugenschluß und Pubertas praecox.

Das Manifestationsalter variiert von den ersten Lebensmonaten bis zum Erwachsenenalter. Die Menarche kann zeitgerecht oder verspätet erfolgen, sekundäre Amenorrhoe ist ein häufiges Symptom.

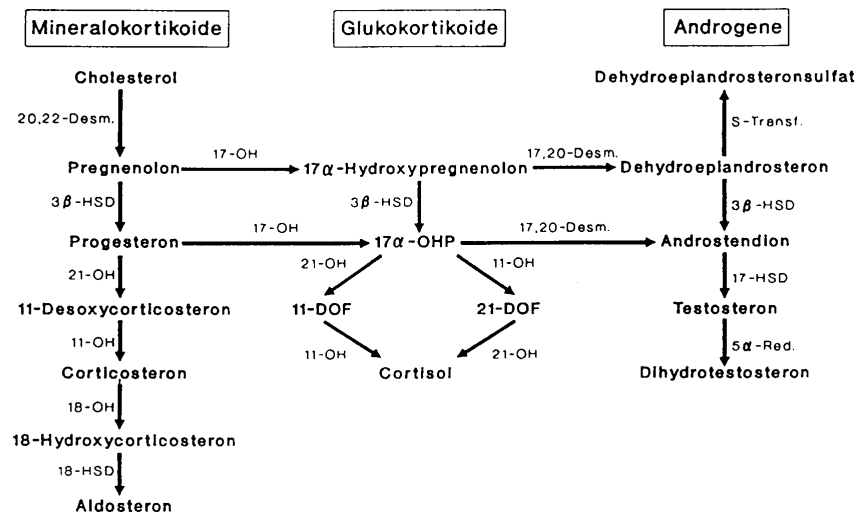


Abbildung 1 Steroidhormonsynthese der Nebennierenrinde

- Diagnostik des AGS

Es sind inzwischen mehrere Enzymstörungen der Steroidbiosynthese bekannt, die ein AGS verursachen können (Abb. 1): 21-OH, 3β-HSD, 11β-OH, 17α-OH und 17,20-Desmolase-Defekt. Störungen der Steroidbiosynthese bei AGS sind auf Mutationen zurückzuführen, welche sich entsprechend der Lokalisation der die Enzyme kodierenden Gene für die 21-OH auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 und für 3β-HSD auf Chromosom 1 ereigneten. Ein Mangel des Enzyms 21-OH, dem bei weitem häufigsten Enzymdefekt der adrenalen Steroidbiosynthese (>90%), führt zu einer verminderten Kortisolsynthese und über einen Feed-back-Mechanismus zu einer vermehrten ACTH-Sekretion (Syndor et al. 1953, Binoux et al. 1972, Ganong et al. 1974). Infolge eines ACTH-Konzentration-Anstiegs steigen die Serumspiegel der Vorstufen des Kortisols, deren Biosynthese nicht der 21-OH bedarf. Durch quantitative Bestimmung der Präkursoren, die sich vor dem Stoffwechselblock der 21-OH nach exogener ACTH-Stimulation ansammeln, ergibt sich eine Möglichkeit zur Diagnostik. Für den Nachweis eines zum AGS führenden Enzymdefektes sind Hormonanalysen aus dem Plasma (sie sind Bestandteil der vorliegenden Untersuchungen und werden am gegebenen Ort ausführlich beschrieben) unumgänglich. Es werden jeweils die Steroidhormone bestimmt,

deren Konzentrationsänderungen aufgrund der Enzymblockierung zu erwarten sind, d.h. für den

- 21-OH-Defekt : 17 α -OHP, 21-DOF,
- 3 β -HSD-Defekt : DHEA, DHEAS,
- 11-OH-Defekt : 11-DOF, 17 α -OHP.

Darüber hinaus sollten F, LH und FSH analysiert werden. Als absichernde und weiterführende Diagnostik schließen sich genetische Untersuchungen an (Chromosomenanalyse, DNA-Analyse mit Hilfe von Southern-Blotting, Polymerasekettenreaktion, allelspezifische Oligonukleotid-Hybridisierung). Ihre Anwendung ist gerechtfertigt, wenn hormonanalytische Befunde einen der o.g. Enzymdefekte wahrscheinlich machen.

Nachfolgend werden die bisher bekannten Methoden zur molekulargenetischen Diagnostik der 21-OH-Defizienz näher beschrieben:

1. Direkte Untersuchung der 21-OH-Gene (*CYP21*, *CYP21P*): Der Nachweis von Deletionen (25-30% der Mutationen) erfolgt mittels Southern-Blotting oder durch unspezifische Amplifikation der beiden Gene durch die Polymerasekettenreaktion (PCR).

Der Nachweis von Punktmutationen (75% der AGS-Patienten) erfordert zunächst die spezifische Amplifikation des *CYP21*, um Verunreinigungen durch das Pseudogen in der weiteren Analytik auszuschließen. Die erhaltenen PCR-Produkte können durch verschiedene Methoden auf Veränderungen der Gensequenz untersucht werden:

- a) Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) bei Mutationen, die Schnittstellen von relativ selten schneidenden Restriktionsenzymen verändern.
- b) Allelspezifische Oligonukleotidhybridisierung (ASO). Die PCR-Fragmente werden als Dot-Blot mit markierten Oligonukleotiden inkubiert, die nur für eine Sequenz (Wildtyp oder mutiert) spezifisch sind.
- c) Allelspezifische PCR: Einer der beiden Primer in der PCR-Reaktion bindet nur an die normale oder die mutierte Sequenz, d.h. das entstehende PCR-Produkt ist für die Mutationsstelle sequenzspezifisch.
- d) Direkte Sequenzanalyse (manuelle radioaktive bzw. nichtradioaktive oder automatische DNA-Sequenzierung). Diese Methode erlaubt als einzige auch den Nachweis von bisher nicht bekannten Mutationen.
- e) Einzelstrangkonnformationspolymorphismus (SSCP) bzw. Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE) zum Mutationsnachweis Strukturveränderungen einzelsträngiger DNA.
- f) Die Ligasekettenreaktion (LCR) ist eine spezielle Art der Amplifikationsmethode für DNA, die hohe Anforderung an die Geräteausstattung stellt.

- 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD)-Defizienz

Dieses Enzym wird in allen drei Synthesewegen der Steroidhormone benötigt (Abb. 1). Seine verminderte Aktivität bewirkt daher eine Verminderung der Produktion von Aldosteron, Kortisol und Testosteron, die durch eine NNR-Hyperplasie kompensiert wird. Im Plasma der betroffenen Patienten findet man eine Erhöhung des schwach wirksamen Androgens DHEA und seines Sulfats DHEAS. Sie sind der Ausgangspunkt für die periphere Konversion zu Androgenen und Östrogenen; 80%-90% der männlichen Östrogene stammen aus dieser Umwandlung, der Rest ist testikulären Ursprungs (Krause, 1991).

DHEAS hat eine besondere Bedeutung als Vorläufer für die gonadale, plazentare und periphere Sexualhormonsynthese (Labrie, 1991). Im Rahmen dieser Arbeit wurde es als Marker für 3 β -HSD-Defizienzen genutzt.

Erste Beschreibungen klassischer 3 β -HSD-Defizienzen mit Salzverlust bei drei Neugeborenen liegen von Bongiovanni (1961) vor. Die Enzymdefizienz wurde anhand stark erhöhter Δ 5-Ketosteroide und nicht nachweisbarer Δ 4-Ketosteroide im Urin diagnostiziert. Alle drei Patienten verstarben infolge SVS innerhalb weniger Wochen. Post mortem wurde in der Autopsie die adrenale Hyperplasie gefunden.

Eine nichtklassische Form dieser Enzymdefizienz bei einem 25-jährigen Mann wurde von Nowakowski und Püschel (1952) ausführlich beschrieben. Obwohl noch nicht als 3 β -HSD-Defizienz bezeichnet, ist diese Enzymdefizienz in der Beschreibung an der erhöhten

Ausscheidung von $\Delta 5$ -Ketosteroiden im Urin erkennbar. Von besonderem Interesse an dieser ausführlichen Beschreibung ist, daß eine höhere Prävalenz der als nichtklassisch einzustufenden Form des AGS bei als genuin diagnostizierten männlichen Fertilitätsstörungen angenommen wird. Inzwischen liegen zahlreiche Beschreibungen von Fällen des durch 3β -HSD-Defizienz erzeugten nichtklassischen AGS in der internationalen Literatur vor. Von Zerah et al. (1991, 1994) wird für die nichtklassische 3β -HSD-Defizienz eine höhere Prävalenz als für die nichtklassische 21-OH-Defizienz angenommen.

Die Symptomatik der nichtklassischen 3β -HSD-Defizienz ähnelt bei weiblichen Patienten der nicht-klassischen 21-OH-Defizienz, so daß für eine differenzierende Diagnostik nicht-klassischer Fälle des AGS die Ergebnisse einer Hormonanalytik entscheidend sind.

- Hormonanalytischer Nachweis der 3β -HSD-Defizienz

In der Beschreibung einer hyperandrogenämischen Ovarialinsuffizienz mit Virilismus wird von Bradbury und Slate (1955) die Messung erhöhter Mengen von DHEA und DHEAS sowie deren Suppression mit Kortison als Marker spezifischer Fälle der adrenalen Hyperplasie vorgeschlagen. Pang et al. (1983, 1985) wenden die ACTH-Stimulierung sowie die Dexamethasonsuppression und die Bestimmung der Verhältnisse der $\Delta 5$ - zu den $\Delta 4$ -Steroiden zum hormonanalytischen Nachweis des 3β -HSD-Mangels in Fällen von prämaturer Pubarche mit nichtklassischem AGS an. Es wurden erhöhte Werte des Quotienten von Pregnenolon zu Progesteron, 17-Hydroxypregnenolon zu 17α -OHP und von DHEA zu Androstendion bzw. zu Testosteron basal als auch nach ACTH-Stimulierung gefunden.

Altersunspezifische basale und nach ACTH-Test erhöhte Androstendion- und Testosteronwerte sowie die Metabolisierung von infundiertem radioaktiv markiertem DHEA zu Testosteron gaben bei Fällen mit 3β -HSD-Defizienz Hinweise auf eine intakte periphere 3β -HSD-Funktion. Als Ursache für diese Erscheinung wurde die Existenz von mindestens einem peripher wirksamen Isoenzym der 3β -HSD postuliert (Schneider et al. 1975) und später hormonanalytisch nachgewiesen (Cravioto et al. 1986).

- Struktur der *3b-HSD*-Gene

Lachance et al. (1991) beschrieben Sequenzen und Struktur der *3b-HSD*-Gene *TypI*- und *TypII* mit ca. 93%iger Homologie. Punktmutationen des *3b-HSD-TypII*-Gens wurden in Fällen klassischer und nichtklassischer 3β -HSD-Defizienzen in homozygoter und Compound-heterozygoter Form gefunden (Simard et al. 1993, Mendoza et al. 1993, Simard et al. 1994, Russel et al. 1994), wobei ein gehäuftes Auftreten einer spezifischen Mutation bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

- Häufigkeit und Vorkommen des AGS

Das AGS wird häufiger beim weiblichen Geschlecht beschrieben. Beim männlichen Geschlecht ist das AGS klinisch schwerer zu erkennen. Regional tritt das AGS offensichtlich mit unterschiedlicher Frequenz auf.

Populationsgenetische Erhebungen in nachfolgend genannten Gebieten zeigten folgende Inzidenzwerte: USA 1 : 67000 (Heterozygoten 1 : 128), Schweiz 1 : 5000 (Heterozygoten 1 : 35), Alaska 1 : 1481 (Heterozygoten 1 : 20, Genfrequenz 0,026), Isolat der Yupik-Eskimos im Südwesten Alaskas 1 : 490 (Heterozygoten 1 : 11, Genfrequenz 0,055). In Abhängigkeit von der Population wiesen 75 bis 90% der Fälle Defekte der 21-OH (Inzidenz 1 : 10 000) auf. Von anderen Formen des AGS sind nur wenige Fälle bekannt (Witkowski et al. 1991).

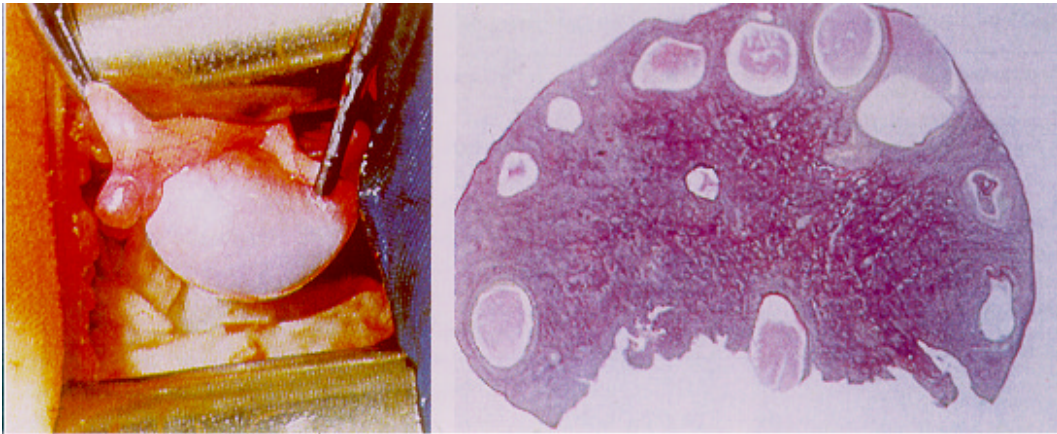


Abbildung 2: Polyzystisches Ovar (links) und Schnittbild durch ein polyzystisches Ovar (rechts) mit zahlreichen subkapsulären Zysten (Quelle: Schmidt-Matthiesen/Hepp, 1998)

• Das Polyzystische Ovar-Syndrom (PCOS)

• Definition und klinische Symptome des PCOS

PCOS ist eine häufig beobachtete endokrine Erkrankung unbekannter Ätiologie.

1935 beschrieben Stein und Leventhal ein klinisches Syndrom, bei dem Sterilität, Amenorrhoe, Hirsutismus, Adipositas und vergrößerte zystische Ovarien auftraten.

PCOS ist ein bei Störungen im Androgenhaushalt häufig beobachteter Symptomenkomplex. Es ist keine Erkrankung sui generis, sondern umfaßt eine Reihe von morphologischen und funktionellen Veränderungen der Ovarien, die mit einigen klinischen Merkmalen mehr oder weniger häufig kombiniert sind.

Dabei können folgende Merkmale auftreten: 1. Subfertilität oder Infertilität, im Falle einer Konzeption mit erhöhter Abortgefahr, 2. Hyposexualität, 3. deutlich erhöhtes Risiko für Mammakarzinome (Cowan et al. 1981) sowie 4. erhöhtes Risiko für Arteriosklerose, Koronarinsuffizienz, Herzinfarkt und Schlaganfälle (Björntop, 1996).

Die für das PCOS typischen klinischen Symptome werden in vielen Fällen schon während der Pubertät oder Adoleszenz deutlich. Eine zuverlässige Erfassung der Prävalenz des PCOS wird durch die klinische Variabilität und oft verschiedene diagnostische Kriterien erschwert (Adams et al. 1986, Hull et al. 1987 Geisthövel, 1998).

Das PCOS präsentiert sich meistens kombiniert mit einem oder mehreren der folgenden Symptome, wie sie in der Tabelle 1 zusammengefaßt sind.

Tabelle 1: Klinische Symptome, die häufig mit PCOS einhergehen (Quelle: Leidenberger, 1992).

Symptom	Häufigkeit in %
Oligo-/Amenorrhoe	51
Virilisierung	31
Hirsutismus, Akne	69
Übergewicht	41
Dysfunktionelle Blutungen	29
Sterilität	74
Galaktorrhoe	?
Diabetes mellitus	?
Androgenetische Alopezie	?

Wie aus der Tabelle ersichtlich, sind die häufigsten Symptome, die bei einem PCOS angetroffen werden können, Sterilität, Hirsutismus und Akne. Galaktorrhoe, Diabetes mellitus und Androgenetische Alopezie kommen zwar vor, sind aber wesentlich seltener. Eine zusätzliche gravierende Komplikation, die gehäuft bei PCOS auftritt, ist das Ovarielle Überstimulations-Syndrom (OHSS). Das OHSS stellt ein sehr gefährliches Krankheitsbild dar, das im Zusammenhang mit einer Hormongabe bei der von diesen

Patientinnen häufig angestrebten Kinderwunschbehandlung auftritt. Dabei kann es zu extremer Vergrößerung der Ovarien, Übelkeit und Erbrechen kommen. Durch Wasseransammlung im Bauchraum (Ascites) oder Brustkorb (Pleuraerguß) besteht die Gefahr einer Atmungsbehinderung. Eine weitere sehr gefürchtete Komplikation ist eine Thrombose mit dem Risiko einer Lungenembolie.

Insgesamt kann das klinische Bild eines PCOS zwar inhomogen erscheinen, im häufigsten Fall führt es jedoch zu einer anovulatorischen Infertilität. Als treffendste Bezeichnung für dieses Syndrom dürfen die Begriffe hyperandrogenämische Anovulation, hyperandrogenämische Ovarialinsuffizienz oder funktionelle ovarielle Hyperandrogenämie gelten (Keck et al. 1997). Das Konzept, daß das PCOS als eine Form der dysfunktionellen ovariellen Hyperandrogenämie zu verstehen ist, wird durch Stimulationsstudien mit GnRH-Agonisten erhärtet. Die Untersuchungsergebnisse zahlreicher Studien bestätigen, daß die ovarielle Dysregulation auf eine Störung der Steroidbiosynthese zurückzuführen ist (Polson et al. 1988, Franks, 1989, Leidenberger et al. 1992, Talbot et al. 1996, Franks et al. 1998, Aziz et al. 1998).

Morphologie

Häufige morphologische Kennzeichen des PCOS sind nach Leidenberger (1992):

- Vergrößerung der Ovarien
- Normale Anzahl von Primordialfollikeln
- Erhöhte Anzahl reifender und atretisierender Follikel der frühen Stadien
- Hyperplastische Theka-interna-Zellschicht
- Schmalere Granulosazellschicht
- Verdickte Lamina basalis
- Kollagenisierung der verdickten Tunica albuginea
- Verdickung des kortikalen, subkortikalen und medullären Stromas
- Luteinzellnester im Stroma (in ausgeprägten Fällen)
- Erhöhte Anzahl von Hiluszellnestern
- Hyperthekosis (Luteinzellnester im verdickten Stroma)
- Keine Follikeldominanz

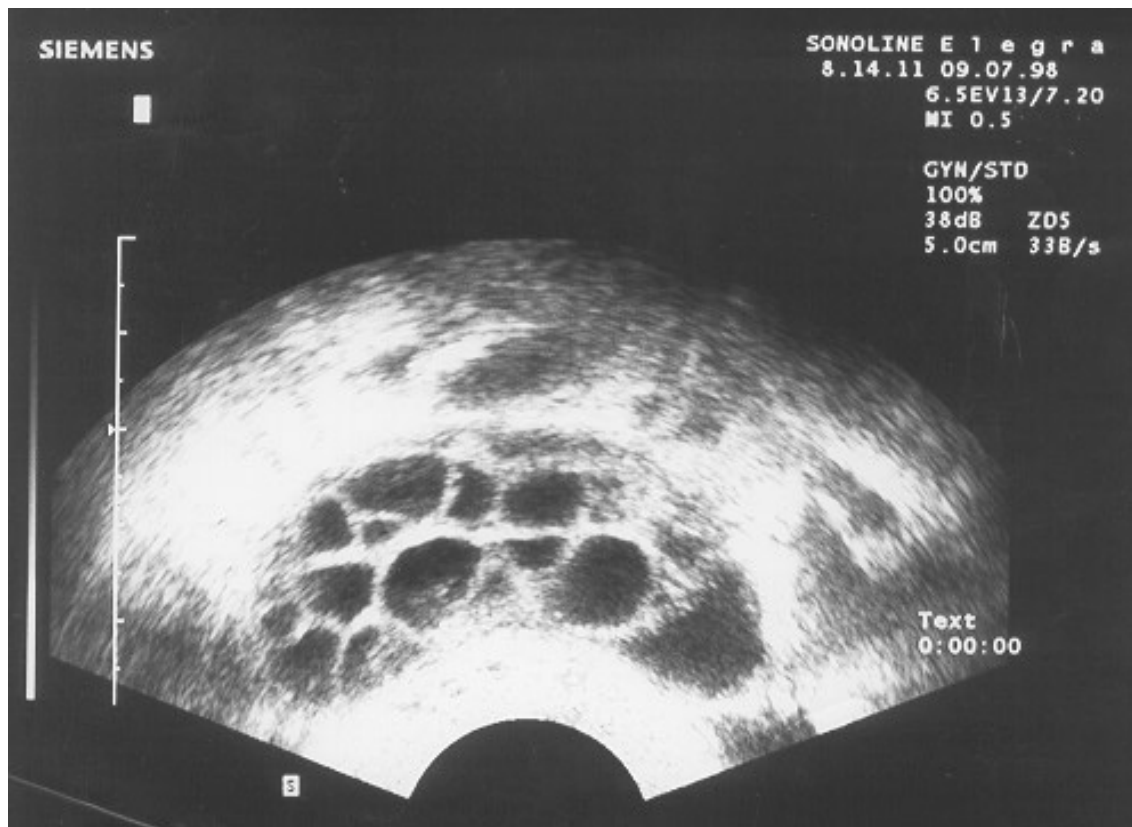


Abbildung 3: Transvaginalsonographische Darstellung des rechten Ovars bei einer 34jährigen Patientin mit PCOS: Durchmesser des Ovars 3,58 cm; typischer Follikelkranz und multiple Follikel kleiner als 10 mm. Zu erkennen ist eine angedeutete Verdickung der Tunica albuginea (Quelle; Frauenpoliklinik, Charité-HUB, 1998).

- Häufigkeit des PCOS

Polyzystische Ovarien, definiert als Ovarien, die 10 oder mehr Follikel von 2 - 8 mm Durchmesser und eine Zunahme des ovariellen Stromas aufweisen (Abb. 5), findet man bei mindestens 25 % aller Frauen, die an sekundärer Amenorrhoe erkrankt sind und bei mehr als 50 % aller oligomenorrhoeischen oder an Hirsutismus leidenden Frauen (Franks et al. 1998).

PCOS ist eine der häufigsten, wenn nicht die häufigste Begleiterscheinung bei Verzögerung der Pubertät bzw. der Menarche oder bei oligomenorrhoeischen, irregulären Blutungsintervallen im 2. Lebensjahrzehnt (Stanhope et al. 1988).

Das sonographisch erscheinende polyzystische Ovar ist auch ein häufiger Befund in einer unselektierten Bevölkerung (Polson et al. 1988). Polyzystische Ovarien findet man in einer unausgewählten Gruppe bei etwa jeder 4. Frau. Von den Frauen mit einem sonografisch dokumentierten polyzystische Ovarien haben etwa 75% irreguläre Zyklen. Unter den vielen Frauen mit regulären Zyklen und PCO finden sich viele mit Hirsutismus.

- Ursachen und Diagnostik des PCOS

Die Differentialdiagnose eines PCOS ist Aufgrund der variablen Symptomatik für den Kliniker sehr schwierig. Leidenberger (1992) interpretiert das PCOS als Endpunkt eines längeren, möglicherweise pränatalen Prozesses, an dessen Anfang ein Androgenexzeß unterschiedlicher Ursache steht. Mögliche Quellen und Ursachen eines Androgenexzesses sind:

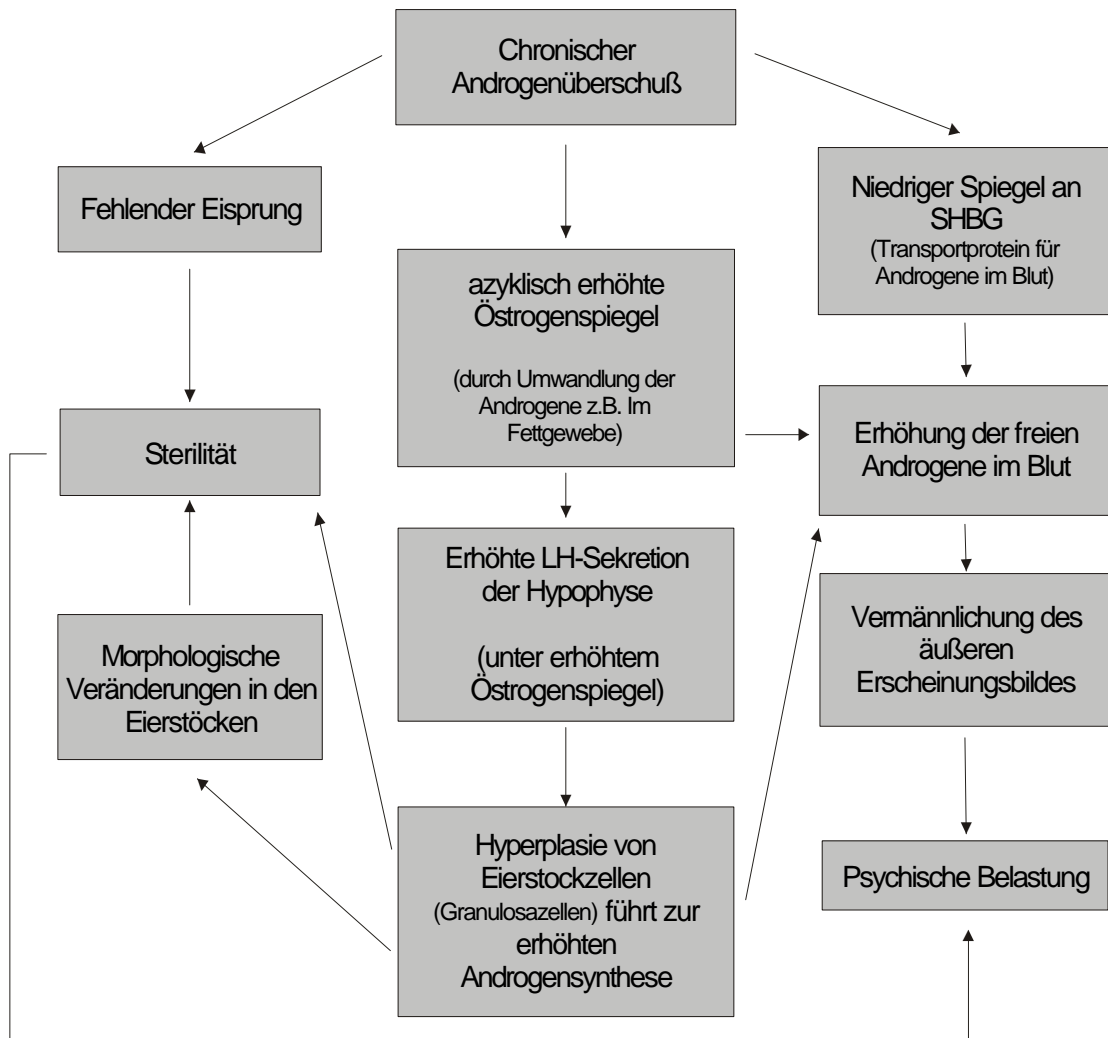


Abbildung 4: Pathogenese des PCOS modifiziert nach Barnes et al. 1994.

- Exzessive Adrenarche
- Adrenale Enzymdefekte (genetisch bedingt)
- Exogene Androgenverabreichung
- Adrenale Übersekretion von Androgenen bei Übergewicht
- Chronische Hyperprolaktinämie
- Androgenexzeß anderer Ursache (z.B. androgenbildende Tumoren)

Die heutigen Vorstellungen bezüglich der Mechanismen, die zu einem PCOS führen können, sind in folgender Abbildung zusammengefaßt.

PCOS ist ein Symptomenkomplex, der über den Anfang der zur Störung im Androgenhaushalt führenden pathologischen Kette nichts aussagt. PCOS kann mit Hilfe der Ultraschalldiagnostik, der Palpation und der Laparoskopie festgestellt werden. Vom Nachweis eines PCOS ist nicht nur die Art der Therapie abhängig, sondern auch die Abschätzung der Komplikationen, bei einer Stimulationsbehandlung der Ovarien Mehrlingsschwangerschaften zu induzieren (Leidenberger, 1992). In den letzten Jahren hat sich die Vaginalsonographie zur Klärung der Ovarienmorphologie bewährt (Breckwoldt et al. 1984). Die Diagnose der Polyzystischen Ovarien erfolgt sonographisch durch das Auffinden von vergrößerten Ovarien, kleinen randständigen Follikel, hyperdensen Stroma und verdickter Tunica albuginea. PCOS ist oftmals mit Symptomen der nicht-klassischen Form des AGS vergesellschaftet. Dadurch, daß polyzystische Ovarien Androgene bilden, die gleichartige Symptome wie erhöhte Nebennierenandrogen-Konzentrationen hervorrufen, ergibt sich die Notwendigkeit der Differentialdiagnose.

- **Hormonbefunde bei PCOS**

Über 90% der Frauen mit sonographisch nachgewiesenen PCO zeigen hormonelle Veränderungen, wie sie für dieses Syndrom typisch sind (Talbot et al. 1996, Polson et al. 1988). Dabei ergeben die im Blut und Urin gefundenen Hormon-Konzentrationen kein einheitliches Bild. Am häufigsten findet man hohe LH-Spiegel als Folge chronischer Anovulation und kontinuierlicher Östrogenwirkung auf die Hypophyse sowie normale bis niedrige Spiegel des FSH. Der LH-FSH-Quotient ist häufig größer als 2 - 3. Ortmann et al. (1998) sprechen von einer Dysregulation der Gonadotropinsekretion. Zudem treten häufig eine exzessive LH-Sekretion nach GnRH-Applikation wie auch eine Erhöhung einer oder mehrerer Androgenparameter (Testosteron, Androstendion, DHEA oder seines Sulfats) auf.

Eine Verminderung der Konzentration des SHBG kann als Folge der verstärkten Androgenwirkung auf die Leber und einer im Rahmen der Ovarfunktionsstörung verminderter Östrogenwirkung gefunden werden. Die SHBG-Erniedrigung führt zur Erhöhung des freien Anteils von Androgenen. Dadurch nimmt die Wahrscheinlichkeit von Androgenisierungserscheinungen in der Haut zu. Frauen mit und ohne Hirsutismus unterscheiden sich voneinander nicht in ihren durchschnittlichen Androgenkonzentrationen und dem LH-FSH-Quotient, wohl aber hinsichtlich ihrer SHBG-Konzentration.

Zu den klassischen Symptomen des PCOS gehört die Adipositas, die bei 41% der betroffenen Frauen beobachtet wird. Möglicherweise ist in diesem Fall die Hyperandrogenämie die Folge einer Insulinresistenz und Hyperinsulinämie. Da Insulin die ovarielle Androgensekretion steigert, könnte dies eine primäre Ursache sein. Es wurde beobachtet, daß die Reduktion des Körpergewichts zur Abnahme der Insulinresistenz, zu einem Abfall der peripheren Androgenspiegel und zur Normalisierung der Ovarialfunktion führt (Dunaif et al. 1990, Lanzzone et al. 1996, Dunaif et al. 1999).

- **Idiopathische Oligospermie**

- **Allgemeines über Fertilitätsstörungen des Mannes**

Nur wenige Generationen vor uns war es - bedingt durch die Stellung des Mannes in der Gesellschaft - üblich, Ursachen für eine ungewollte Kinderlosigkeit überwiegend bei der Frau zu suchen. Im Laufe der Jahrzehnte entwickelte sich bis in die Gegenwart die allgemeine Akzeptanz der Tatsache, daß beide Geschlechter einen maßgeblichen Anteil an der Sterilität einer Partnerschaft haben können. Nach Schirren et al. (1980) z.B. sind 30-35 % der ungewollt kinderlosen Partnerbeziehungen ausschließlich durch Störungen von Seiten des Mannes, etwa 20% durch beide Partner und 45-50% durch Erkrankungen der Fortpflanzungsorgane der Frau verursacht. Diagnostik und Behandlung eines sterilen Paares fallen in das Aufgabengebiet von Andrologen und Gynäkologen, deren enge Zusammenarbeit für das Gelingen einer Behandlung von großem Nutzen ist. Etwa 90-95% der Patienten der Andrologischen Ambulanz des Charité-Universitätsklinikums der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin stellen sich dort wegen unerfüllten Kinderwunsches vor. Für schätzungsweise 50% der Männer, deren Spermioogramme pathologische Befunde aufweisen, bleiben allerdings die Versuche zur Klärung der Ätiogenese der Oligo-, Astheno- bzw. Teratozoospermie ohne Erfolg. Die somit zu stellende Diagnose „idiopathische Fertilitätsstörung“ kann das betroffene Paar und den Arzt nicht zufriedenstellen. Sie läßt nur ungezielte Therapieversuche mit geringen Erfolgsaussichten zu. Beruhend auf dieser Tatsache wird es notwendig, weitere Methoden zur Ursachenfindung von Fertilitätsstörungen zu entwickeln, um so neue Chancen für prophylaktisches und therapeutisches Eingreifen zu eröffnen. In den letzten Jahrzehnten wurde ein Anstieg der Prävalenz von Fertilitätsstörungen (etwa 10% der geschlechtsreifen Männer und Frauen in der Allgemeinbevölkerung) beobachtet, wobei ein höheres Alter der Partner bei einem Schwangerschaftswunsch wesentlich dazu beitragen soll (Nieschlag, 1992). Nach Schirren und Doepfner bezeichnet der Begriff Fertilität die Fähigkeit, Nachkommen zu zeugen, d.h. ein Funktionieren von Potentia coeundi und generandi (Hohlweg, 1966). Diese Definition legt eine Unterteilung der

Fertilitätsstörungen in solche der Potentia coudi- d.h. der Kohabitationsfähigkeit- und der Potentia generandi - der Zeugungsfähigkeit - nahe. Einen Überblick über wichtige und wahrscheinliche Ursachen von Fertilitätsstörungen beim Mann in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit gibt die Tabelle 2. Die Vielzahl der aus dieser Tabelle ersichtlichen Einflußfaktoren auf die Zeugungsfähigkeit eines Mannes legt nahe, daß die ätiologische Klärung sehr langwierig und schwer sein kann. Dazu kommt, daß bis heute noch nicht alle pathophysiologischen Mechanismen der Hoden- und Nebenhodenerkrankungen geklärt sind. Das äußert sich im hohen Prozentsatz der als idiopathisch bezeichneten Fertilitätsstörungen. Genetische Aberrationen können auch Ursache für männliche Infertilität sein (Morris & Gleicher, 1996). Dabei spielen Aberrationen des Y-Chromosoms die wichtigste Rolle. In den letzten Jahren konnten spezifische männliche Fertilitätsgene auf dem Y-Chromosom identifiziert werden (Reijo et al. 1995). Vogt et al. (1995, 1996) postulierten assoziierte Gene auf dem Y-Chromosom, die bedeutsam für Spermatogenesestörungen sind. Darüber hinaus spielen Y-Chromosomale Mikrodeletionen bei der männlichen Infertilität eine wichtige Rolle (Cooke & Elliott, 1997). Aber auch im Rahmen von Krankheiten, die durch spezifischen Genmutationen verursacht werden und den Steroidhormonkreislauf beeinträchtigen, können Spermatogenesestörungen auftreten. Für den Testosteronhaushalt sind hier bisher Mutationen in Genloci für die 3β -HSD, 17α -OH und 5α -Reduktase untersucht (Simard et al. 1994, Andersson et al. 1996, Geller et al. 1997).

Tabelle 2: Ursachen für Fertilitätsstörungen des Mannes nach einer Studie am Institut für Reproduktionsmedizin der Universität Münster; n=5000 (Niederschlag 1992)

Ursachen der Fertilitätsstörungen	Bemerkungen	Prozent. Anteil
Idiopathische Fertilitätsstörungen	Ätiologie unbekannt	30,2 %
Varikozele	Meist links; chronische venöse Durchblutungsstörung (Temperaturerhöhung u.a.)	14,4 %
Endokrine Erkrankungen	z. B. primärer, sekundärer Hypogonadismus, Hypothyreose, Akromegalie	9,7 %
Infektionen	z. B. Chlamydien, fakultativ anaerobe Bakterien, Gonorrhö, Mumps	8,7 %
Lageanomalien der Hoden	Maldescensus testis	8,0 %
Störungen der Samendeposition	z. B. Epi- und Hypospadie, erektile Dysfunktion, retrograde Ejakulation	6,7 %
Allgemeinerkrankungen	Diabetes mellitus, arterielle Verschußkrankheit, Lebererkrankungen u.a.	5,2 %
Spermienantikörper	Autoimmunität, Antikörper der Frau	3,8 %
Hodentumoren		2,1 %
Obstruktionen	z. B. des Ductus deferens, Phimose	1,5 %
Rest	Medikamente (Zytostatika, Kortikoide, Androgene), Nikotin, Röntgenstrahlung, Hitze, Toxine, Traumen, genitale Fehlbildungen usw.	8,3 %

- Idiopathische Oligospermie und Enzym-Defizienzen

Als Oligospermie wird bezeichnet, wenn sich weniger als 20 Mio Spermien pro ml im Sperma finden.

Krause (1991) beschreibt alle idiopathischen Spermatogenesestörungen als Veränderungen der Aktivität des Samenepithels, die bisher nicht durch übergeordnete Störungen oder eigenständige Krankheiten erklärbar sind. Dazu zählen:

- Maldescensus testis (auch behandelt),
- Adnexitis (akut und chronisch),

- Mumpsorchitis,
- Varikozele (mittleren bis schweren Grades),
- Spermatozele,
- Spermien-Antikörper,
- Tumoren der Urogenitalorgane.

Die Gruppe um Dörner untersucht seit langem den Einfluß von Hormonstörungen auf die Sexualentwicklung und Fertilität. Tierexperimentelle Untersuchungen ergaben, daß durch erhöhte prä- bzw. neonatale Östrogenspiegel bei weiblichen Tieren ein Stein-Leventhal-Syndrom-ähnliches Bild (hyperandrogenämische Ovarialinsuffizienz), bei männlichen Ratten dagegen Spermiogenesestörungen resultieren können (Dörner, 1976). Derartige, mit erhöhter Östrogenproduktion einhergehende Hormonstörungen können auch durch angeborene Defekte der 21-OH oder 3 β -HSD verursacht werden (Dörner, 1992).

Beruhend auf diesen Erkenntnissen vermutete Dörner ähnliche Pathomechanismen auch beim Menschen. Immer häufiger wurden in den letzten Jahren Enzymdefekte der Steroidbiosynthese bei Frauen, insbesondere Spätformen des 21-OH- und 3 β -HSD-Mangels, als Ursache von Hirsutismus und Zyklusstörungen gefunden. Es ist daher denkbar, daß derartige Enzymstörungen auch für Einschränkungen der männlichen Fertilität verantwortlich sind (Frank-Raue et al. 1989). Für den 21-OH-Mangel wiesen Milewicz und Medras (1987) eine Assoziation heterozygoter und nicht-klassischer Formen mit idiopathischen Oligospermien in vier von 19 Fällen nach. Frank-Raue et al. (1989) konnten bei sechs infertilen Männern einen schwachen 3 β -HSD-Defizienz diagnostizieren.

In der Literatur gibt es zunehmend Hinweise auf bisher unterschätzte Häufigkeiten nichtklassischer und heterozygoter Formen der 21-OH- und 3 β -HSD-Defizienzen (New et al. 1983, Loren et al. 1985, Frank-Raue et al. 1989, Speiser et al. 1989, 1990, New, 1992). Etwa 5-6% aller Menschen sollen heterozygote Träger von CYP21-Mutationen sein (Speiser et al. 1985). Wenn schwache Enzymmangelzustände so häufig auftreten, ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß sie - bisher unerkannt - Störungen der Spermiogenese bedingen.

Ergebnisse bisheriger Untersuchungen und die sich daraus ergebenden Hinweise weckten das Interesse, Männer mit idiopathischen Fertilitätsstörungen auf einen Enzymdefekt zu untersuchen. Dabei wäre möglicherweise eine leichte Enzymdefizienz der Steroidbiosynthese zu erwarten, obwohl die betroffenen Patienten keinerlei Symptome eines klassischen Adrenogenitalen Syndroms - mit Ausnahme der Oligozoospermie - zeigen.

In der 80er Jahren gelang es New et al. (1983) mit Hilfe von Hormonanalysen (17 α -OHP - vor und nach ACTH-Stimulation), Patienten mit klassischer, nichtklassischer und heterozygoter 21-OH-Defizienz und Kontrollen zumindest teilweise voneinander zu unterscheiden. Milewicz und Medras (1987) fanden drei heterozygote Anlageträger und einen Patienten mit nichtklassischem 21-OH-Mangel durch Bestimmung von 21-DOF und 17 α -OHP aus dem Blutplasma (ebenfalls mit ACTH-Test). Diese Ergebnisse legen die Möglichkeit nahe, mittels hormonanalytischer Methoden auch heterozygote Formen von Steroidhormon-Synthesestörungen zu diagnostizieren.

Ein sicheres Verfahren zur Erkennung einer 21-OH-Defizienz ist jedoch durch molekulargenetische Untersuchungen gegeben. Owerbach et al. (1992) und Helmberg et al. (1992) entwickelten Methoden, um den Zustand des 21-OH-Gens (CYP21) von Patienten mit AGS zu bestimmen.

- **Aufgabenstellung**

Forschungen der Gruppe um Dörner erbrachten Hinweise auf einen Zusammenhang der Ätiopathogenese von Fertilitätsstörungen mit partiellen 21-OH- bzw. 3 β -HSD-Defizienzen (Dörner, 1976, 1996, 1998).

Erste hormonanalytische Untersuchungen wiesen auf verminderte Aktivitäten des adrenalen Enzyms 21-OH und des adrenalen/gonadalen Enzyms 3 β -HSD hin.

Im Vordergrund standen dabei hormonanalytische Untersuchungen bei PCOS und idiopathischer Oligospermie, deren Frequenz weltweit erkennbar zugenommen hat.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die hormonanalytischen Untersuchungen weitergeführt und erstmalig molekulargenetischen Untersuchungen einbezogen werden.

Dazu war es notwendig, eine für die Fragestellung geeignete spezielle Methodik zu entwickeln bzw. zu prüfen.

Als positive Kontrolle für *CYP21*-Mutationen sollte eine AGS-Stichprobe einbezogen werden. Bei funktionierender Methodik und guter Korrelation zwischen hormonellen und molekulargenetischen Befunden war zu prüfen, ob das Verfahren als methodische Strategie zur kausalen Diagnostik von Fertilitätsstörungen Anwendung finden kann.

Stichprobenauswahl und Methodik

• Die Patientenkollektive

AGS-Stichprobe:

62 Patienten aus 62 nicht miteinander verwandten, klinisch charakterisierten AGS-Familien wurden in der IV. Klinik für Innere Medizin des Universitätsklinikums Charité-Berlin und in der Kinderklinik des Eberhard-Karls-Universitätsklinikums Tübingen untersucht. Das mittlere Alter der 41 weiblichen und der 21 männlichen Patienten lag bei 20 Jahren (zwischen 2 und 55 Jahren). 26 Patientinnen und 11 Patienten wiesen eine klassische AGS-Form mit Salzverlust-Syndrom auf. Drei Patientinnen und ein Patient zeigten eine nicht-klassische Form. 14 Patientinnen und sieben Patienten wiesen eine einfach virilisierende Form des AGS auf.

PCOS-Stichprobe:

Die Stichprobe PCOS entstammte aus der Kinderwunsch-Sprechstunde der Frauenklinik der Charité. Als erstes Auswahlkriterium diente die PCO-Diagnose mittels vaginalem Ultraschall sowie Anamnese und körperliche Untersuchung in Bezug auf Hirsutismus und Akne. Das Vorliegen von Zyklusstörungen wie Amenorrhoe und Oligomenorrhoe diente als weiteres Diagnosekriterium.

Bei den 17 Teilnehmerinnen der Kontrollgruppe wurden alle diagnostisch wichtigen Merkmale berücksichtigt und das Vorliegen eines PCOS ausgeschlossen. Die Untersuchungen erfolgten nach der schriftlichen Einwilligung der Probandinnen.

Alle so diagnostizierten Studienteilnehmerinnen wurden mit einem ACTH-Test im Labor der IV. Medizinischen Klinik der Charité untersucht. Die Analyse der gewonnenen Blutproben wurde im Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité vorgenommen. Nach Auswertung der klinischen Untersuchungen wurden 21 Patientinnen in die Studie eingeschlossen.

IO-Stichprobe:

Bei Männern mit IO aus der Andrologischen Ambulanz der Charité wurden bekannte mögliche Faktoren für Spermatogenesestörung ausgeschlossen. Kontrollen ergaben, daß die Probanden dieser Stichprobe keine zytogenetischen Auffälligkeiten aufweisen. Für die geplanten Untersuchungen der Stichprobe waren 50 Patienten der Andrologischen Ambulanz geeignet. Bei ihnen wurde eine Oligospermie unbekannter Ursache diagnostiziert. Auf ein persönliches Anschreiben meldeten sich weniger als 25%, letztendlich waren insgesamt nur 8 Patienten (16%) im Alter zwischen 35 und 45 Jahren bereit, an dieser Studie teilzunehmen. Bei drei dieser Patienten lagen Hormonbefunde vor. Um die Patienten nach gezielten Kriterien bewerten zu können, waren eine ausführliche Erhebung der Anamnese und des Status *praesens*, die Auswertung von Spermiogrammen und verschiedene Blutuntersuchungen notwendig. Es wurde hierfür eine Festlegung der Spermatozoenzahlen zwischen 1 und 10 Millionen pro ml getroffen. Dabei läßt sich dieser Bereich als Nachweis einer wirklich eindeutigen Fertilitätsminderung begründen. Azoospermien können auch durch totale Verschlüsse unterschiedlicher Lokalisation bedingt sein. Deshalb sollten Patienten mit einer Azoospermie nicht untersucht werden. Deshalb wurde als untere Grenze für die Auswahl der Patienten eine Spermatozoen-Konzentration von 1×10^6 Spermatozoen pro ml gewählt.

Neben der allgemeinen, Eigen- und Familienanamnese erfaßte die andrologische Befragung zusätzlich alle Störungen hinsichtlich der Sexualfunktion, Erkrankungen, Operationen und Traumen im Bereich der Genitalorgane; die gynäkologische Anamnese der Partnerin, Angaben zum Kinderwunsch und zu chronischen Streßsituationen. Durch eine zytogenetische Voruntersuchung wurde in dieser Stichprobe chromosomale Abberationen ausgeschlossen. Zur Kontrollgruppe gehörten 26 gesunde Männer. Zusätzlich zur Basis-Diagnostik wurde nach schriftlicher Einwilligung bei den Probanden ein ACTH-Test durchgeführt.

- **Molekulargenetische Untersuchung**

- **Vorbemerkung**

Das Ziel unserer Untersuchungen der AGS-Stichprobe bestand neben dem Auffinden Mutationen in *CYP21* und Erstellung einer Genotyp-Phänotyp Korrelation auch in der Optimierung von PCR- und ASO für das jeweilige untersuchte Exon, um ein routinemäßiges und schnelles Mutationsscreening im Rahmen einer AGS-Diagnostik mit hoher Effektivität zu ermöglichen. Aus diesem Grunde werden die Ergebnisse der Optimierungsversuche sowie Standardbedingungen, die für Darstellung der molekulargenetischen Untersuchungsergebnisse gewählt und erfolgreich durchgeführt wurden, vorangestellt.

Screeningmethoden von Mutationen im *CYP21* sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt sehr zeit- und kostenaufwendig. Bei der Auswahl unserer Methoden wurde auf eine möglichst weitreichende Erfassung in Frage kommender Mutationen bei vertretbarem apparativen und zeitlichen Aufwand besonders Wert gelegt.

- **Mutationsanalyse in *CYP21***

CYP21 wurde in den verschiedenen Patientengruppen nach folgendem Schema untersucht.

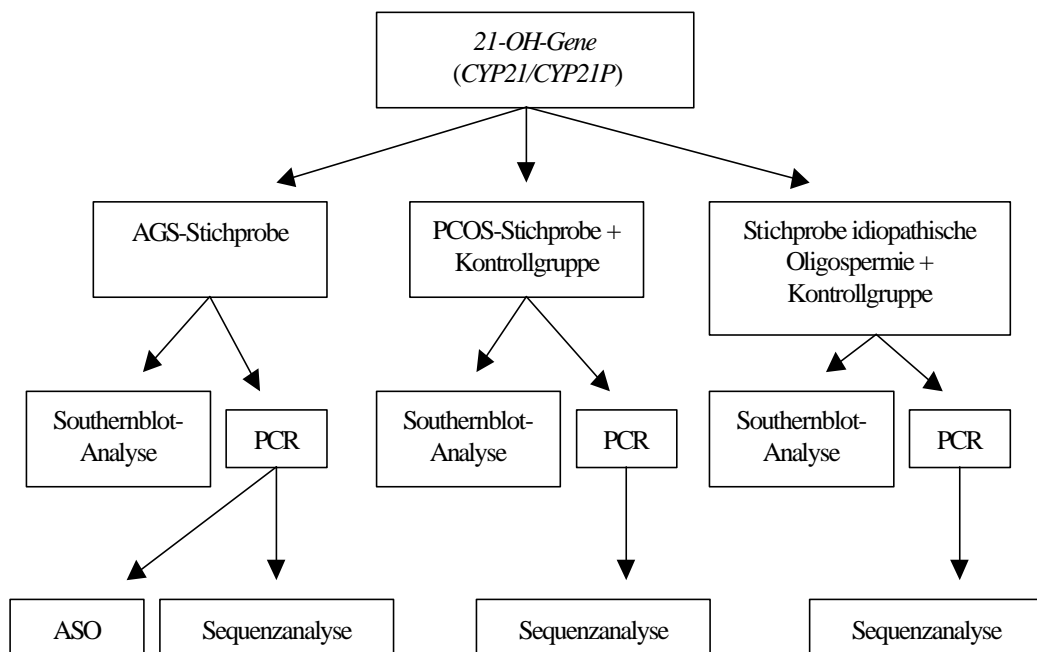


Abbildung 5: Schematische Darstellung der molekulargenetischen Methodik zur Untersuchung der *CYP21*(*CYP21P* / *CYP21*)

Die spezifische Trennung des Pseudogens (*CYP21P*) vom aktiven Gen (*CYP21*) war Voraussetzung für die weiteren Untersuchungen. Zur Unterscheidung zwischen Pseudogen und aktivem Gen sowie zur direkten Mutationsanalyse des *CYP21* wurde aus verschiedenen möglichen Methoden die effektive Technik der Southernblot-Hybridisierung ausgewählt, um große Deletionen und Genkonversionen aufzuspüren. Die spezifische Amplifikation des aktiven *CYP21* erfolgte durch Anwendung von PCR-Techniken, die zu diesem Zweck optimiert wurden. Die Untersuchungen von Punktmutationen erfolgte mit Hilfe von radioaktiver Sequenzierung, da sich diese

Methode als besonders sensitiv erwiesen. Parallel zur Sequenzanalyse wurde bei der AGS-Stichprobe zur Untersuchung der Punktmutationen die Allelspezifischer Oligonukleotid-Hybridisierung (ASO) eingesetzt. Der Einsatz dieser Methode ist bei einer großen Stichprobe empfehlenswert, da diese Methode mit viel weniger Zeitaufwand verbunden ist.

- Verfahrensschritte

- *Präparation genomischer DNA aus Citrat- oder EDTA-Vollblut*

Nach einer venösen Blutentnahme zur Gewinnung peripherer Leukozyten erfolgte eine DNA-Präparation.

Die Präparation der genomischen DNA basierte auf frischem Citrat- oder EDTA- Vollblut in Anlehnung an die von Miller et al. (1987) publizierte Vorschrift. Dementsprechend wurde das Blut (etwa 10 ml) mit einem vierfachen Volumen Kaliumchlorid (50 mM) versetzt und vorsichtig gemischt. Nach der Sedimentation der Leukozyten (1000 rpm, 10 min, 4°C) resuspendierten wir das Pellet in 3 ml Lysepuffer (s. Anhang) sowie 200 µl 10% SDS und 50 µl Proteinase K und inkubierten es entweder bei 50°C für zwei bis drei Stunden oder bei 37°C über Nacht. Dann erfolgte die Phenol- und Chloroformextraktion. Die DNA wurde anschließend mit einem zweifachen Volumen absoluten Ethanol gefällt, auf einen Glasstab aufgewickelt und mit 70%igem Ethanol nachgewaschen. Nachdem die DNA luftgetrocknet war, wurde sie in Aqua bidestillata gelöst und bei 4°C aufbewahrt. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde durch Messung des Absorptionskoeffizienten mit dem Spektralphotometer bei Wellenlängen von 269 nm sowie 280 nm bestimmt und der Quotient aus beiden Absorptionskoeffizienten gebildet. Wenn der Quotient kleiner als 1,8 war, mußte die Chloroformextraktion wiederholt werden, da die entsprechenden Proben einen zu hohen Anteil von Eiweißen aufwiesen.

- *Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli*

Die Plasmid-DNA-Präparation erfolgte nach der Alkali-Lyse-Methode (Sambrook et al. 1989). Vorher wurden die Zellen auf LB-Agar ausgespatelt, der 50 µg/ml Ampicilin enthielt (Sambrook et al. 1989). Die Insertisolierung erfolgte nach Restriktionsverdau der Plasmide mit den Enzymen BamHI und EcoRI unter Benutzung des QIAquick-Gel-Extraction-Kit (Fa. Quiagen).

Die selbstpräparierte p21c/3 Sonde wurde in Anlehnung an White et al. (1992) in der Southernblot-Analyse eingesetzt.

- *Southernblot-Hybridisierung*

Zur effektiven Untersuchung von großen Deletionen bzw. Konversionen des *CYP21* wurde die Southernblot-Hybridisierung eingesetzt (Strumberg et al. 1992). Strategisch sollte die Untersuchung zuerst mit einer Trennung beider Gene (*CYP21P*, *CYP21*) erfolgen. Dabei wurden 6 µg genomischer DNA unter optimalen Bedingungen mit Restriktionsenzymen Taq I und Bgl II und dazugehörigem Puffer für 3 h bei 65°C bzw. 37°C inkubiert. Danach haben wir die Restriktionsansätze gelelektrophoretisch in einem 8%igen Agarosegel aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden die Gele mittels Vakuum geblottet und DNA auf ein Filter transferiert. Die anschließende *In Situ* Fragmentierung erfolgte durch eine Behandlung mit 0,25 N HCl und alkalischem Denaturierungspuffer.

Zur Prähybridisierung der Filter wurden 10 ml von der Prähybridisierungslösung, die auch Heringssperma-DNA enthält, in die Flaschen gefüllt, während die Markierungsreaktion ablief. Der Einsatz von Heringssperma-DNA bewirkt auf dem Filter eine Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen für radioaktiv-markierte DNA.

Die radioaktive Hybridisierung erfolgte mittels High Prime DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim) nach der Empfehlung des Herstellers. Die folgenden Fragmente wurden nach der Hybridisierung mit der p21c/3 Sonde (White et al. 1992) erzielt: eine 3,7 kb große Bande und eine 10 kb große Bande für das aktive *CYP21* und 3,2 kb große Bande und 12 kb große Bande für das Pseudogen. Die Radioautography und die Auswertung erfolgte analog zu 2.2.3.6.

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich sind Produkte des ungleichen Crossing Over 30 kb-Deletionen oder 30 kb-Duplikationen. Homozygote 30 kb-Deletionen stellen sich hierbei in der Southern-Blot-Analyse als fehlende Banden und heterozygote 30 kb-Deletionen oder 30 kb-Duplikationen als vom Wildtyp abweichendes Verhältnis der Bandenstärken dar.

Tabelle 3: Auswertung der Densitometrie mit Hilfe Phospho Imager mit dem Computerprogramm TINA Version 2.09 (Fuji X, BAS 2000)

Mutation	Relative Intensität 10 : 12 kb Bgl II Signale	Relative Intensität 3,2 : 3,7 kb Taq I Signale
30 kb Deletion (heterozygot)	2 : 1	2 : 1
CYP21/CYP21P Konversion	1 : 1	3 : 1
CYP21P Deletion (heterozygot)	2 : 1	1 : 2
CYP21 Deletion (heterozygot)	1 : 2	2 : 1
CYP21P Deletion	Keine 12 kb Fragment	Keine 3,2 kb Fragment
CYP21 Deletion	Keine 10 kb Fragment	Keine 3,7 kb Fragment

2.2.3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR hat sich als eine geeignete Strategie zur Mutationsanalyse der *CYP21*-Gene (*CYP21*, *CYP21P*) etabliert (Higashi et al. 1988, Owerbach et al. 1990, 1992).

Mit Hilfe der PCR können definierte DNA-Sequenzen des aktiven *CYP21* in vitro spezifisch ohne die zu 98% homologen *CYP21P*-Sequenzen schnell amplifiziert werden. Zur Sequenzanalyse von Punktmutationen wurde DNA mit Hilfe der PCR amplifiziert. Beide Gensequenzen (*CYP21*, *CYP21P*) weisen eine Homologie von mehr als 98% auf. Um Abschnitte des aktiven Gens amplifizieren zu können, ohne zugleich auch das homologe Pseudogen *CYP21P* zu erhalten, wurde die Reaktionsbedingungen für die PCR entsprechend spezifisch gewählt und mittels eines Computer-Programmes (2.4.) optimiert. Nach der Optimierung der gewählten Bedingungen gelang es, das *CYP21* in drei Abschnitten amplifizieren zu können. Die Größe der PCR-Fragmente ließ sich mit Hilfe von Standardmarkern abschätzen. Zur Prüfung der PCR-Amplifikationen kam die Agarosegelelektrophorese zum Einsatz (2.4.2.). Die gelelektrophoretische Auftrennung der jeweiligen Amplifikate ist in den Abbildungen 6 und 7 schematisch dargestellt.

- Spezifische Amplifikationen homologer Sequenzen in *CYP21*:

Für die Computer gestützte Trennung der *CYP21*-Gene erwiesen sich 3 Primer-Sets (Tabelle 4) für unsere Untersuchungen als geeignet: Die Primer P2 und P5 decken den Teil in Exon 3 des *CYP21* ab, in dem *CYP21P* eine Deletion von 8 bp aufweist. Aus diesem Grund lagern sich diese Primer nur an die *CYP21*-Sequenz, was eine selektive Amplifikation dieses Gens ermöglicht.

Tabelle 4: Verwendete PCR-Primer zur DNA-Amplifikation

Primer	Sequenz (5' -3')	Position	Art des Primers
P1	GgA cAc TAT Tgc cTg cAg A	1378 – 1397	Sense
P2	AgT AgT cTc ccA Agg AcA	2376 – 2394	Antisense
P3	GTg gTg cTg Aac Tcc AA	1979 – 1996	Sense
P4	GcA TcT ccA cgA TgT gA	3053 – 3070	Antisense
P5	CcT gTc cTT ggg AgA cTA cT	2374 – 2394	Sense
P6	TcA gAT cTc Atc AcT ggT TcT ggc c	4369 – 4394	Antisense

Tabelle 5: Mutationen und deren Positionen auf dem *CYP21*, die in Stichproben von PCOS und idiopathischer Oligospermie untersucht wurden. Die Nukleotidpositionen sind gemäß *CYP21*-BANK, M12792, M23280 angegeben.

Nukleotid-Position	Exon/Intron-Position	Sequenz-Veränderung	Aminosäure-Austausch	Referenz
1767	Exon 1	CcG – cTg	Pro30 – Leu	Tusie et al. 1991
2333	Intron 2	AA/Ac – Ag	Splice Mutation	Higashi et al. 1988
2385-2392	Exon 3	Gag AcT Ac	8 bp deletion	Higashi et al. 1988
2677	Exon 4	Atc – Aac	Ile236 – Asn	Amor et al. 1988
3361	Exon 7	GTg TTg	Val281 – Leu	Speiser et al. 1988
3672	Exon 8	Cag – Tag	Gln318 – stop	Globerman et al. 1988
3736	Exon 8	CgT cAT	Arg339 – His	Helmberg et al. 1992
3786	Exon 8	Cgg-Tgg	Arg356 – Trp	Chiou et al. 1990

4256	Intron 9	Ccc – Tcc	Pro453 – Ser	Helmberg et al. 1992 Owerbach et al. 1992
------	----------	-----------	--------------	--

PCR-Amplifikation Nr. I

In der ersten PCR wurden die ersten beiden Exons und Introns sowie die ersten 30 bp des Exons 3 von *CYP21* beginnend 5' von der TATAA-Box spezifisch amplifiziert. Das PCR-Produkt wies eine Länge von 1000 bp auf.

Die Sequenz des 5'-Primers (P1) enthielt in drei Positionen einzelne Nukleotide, in denen sich *CYP21* von *CYP21P* unterscheidet. Die Sequenz des 3'-Primers (P2) wurde in der Region gewählt, in der das Pseudogen im 3. Exon eine Deletion von 8 bp aufweist.

Die Auftrennung erfolgte in einem 0,8%igen Agarosegel bei einer Spannung von 80 V und einer Laufzeit von 1,5 Stunden in 1 x TAE-Laufpuffer. Als DNA-Standardmarker wurde die 1 kb-Leiter eingesetzt.

PCR-Amplifikation Nr. II

Diese Amplifikation ist für die Sequenz in *CYP21* spezifisch und umfaßt einen Bereich von 1000 bp im Exon 3 beginnend bis in das Intron 6. Die Besonderheit dieser Amplifikation liegt darin, daß lediglich ein Primer (P4) des Primerpaares für diese Sequenz spezifisch ist, während beide *CYP21*-Gene die Sequenz des anderen Primer (P3) gemeinsam haben.

Die 3'-Primerregion liegt im 6. Exon und hat drei Thymidinmoleküle, die im Pseudogen gegen drei Adenosinmoleküle ersetzt sind. Die 5'-Primerregion liegt im 3. Exon, dessen Sequenz beide *CYP21*-Gene gemeinsam haben, weshalb der 5'-Primer nicht zwischen den beiden Genen differenziert.

PCR-Amplifikation Nr. III

Die dritte PCR-Amplifikation überschneidet sich mit der zweiten und liefert ein Produkt von 2000 bp. Die 5'-Primerregion liegt am Ende von Exon 10. Die Sequenz des 5'-Primers beinhaltet wiederum jene Region von Exon 3, in der das Pseudogen *CYP21P* gegenüber dem *CYP21* eine Deletion von 8 bp aufweist. Die 3'-Primerregion im Exon 10 ist bei beiden *CYP21*-Genen identisch, was dazu führen kann, daß der entsprechende DNA-Strang des Pseudogens amplifiziert wird. Er bleibt jedoch einzelsträngig und kann so vom gewünschten doppelsträngigen PCR-Produkt unterschieden werden. Insgesamt entsprechen alle gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Amplifikate (I, II und III) den geforderten Standards. In nachfolgender Tabelle 6 sind die optimierten PCR-Bedingungen der einzelnen Fragmente des *CYP21* noch einmal im Zusammenhang dargestellt.

Tabelle 6: Optimierte PCR-Bedingungen der Fragmente in *CYP21*

PCR Nr.	Thermoprofil/Zyklen	DNA-Konz.	Mg ²⁺	Länge/Exon	
I	96°C –5 min 94°C-1 min,58°C-1 min,72°C-2min 72°C-10min	1x 30x 1x	3ng/µl	1,5mM	1000 bp/ Ex. 1,2, 30 bp v. Ex. 3
II	96°C –4 min, 94°C-1 min,56°C-1 min,72°C-2min 72°C-10min	1x 30x 1x	3ng/µl	1,5mM	1000 bp/ Ex. 3,4,5
III	96°C –5 min, 94°C-1 min,60°C-1 min,72°C-2min 72°C-10min	1x 30x 1x	3ng/µl	1,5mM	2000 bp/ Ex. 4-10

• Mutationsanalyse der 8 bp-Deletion im Exon 3 mittels PCR

Zur Mutationsanalyse der 8bp-Deletion im Exon 3 des *CYP21* haben wir zuerst mittels PCR Tabelle 6 *CYP21*-spezifische Fragmente (ca. 130 bp und 138 bp) unter Einsatz eines korrespondierenden Primers für die 8bp-Deletion beginnend vom Exon 3, in Anlehnung an Rumsby et al. (1993) amplifiziert Tabelle 7. Anschließend wurden die PCR-

Produkte auf einem nicht denaturierenden Gel (Polyacrylamidgel) aufgetrennt und auf einem Trockner bei 80°C auf ein Filter übertragen. Die anschließende Autoradiographie erfolgte analog zu Southernblot-Hybridisierung.

- Kontrolle der PCR-Produkte

Die Kontrolle der Amplifikate fand in einem 0,8-1,5%- igen Agarose-Gel, in welchem Ethidiumbromid (0,05µg/ml, Boehringer) gelöst war, statt (s. Anhang). Dazu wurde das Agarosegel in einer Elektrophoresekammer (Hybaid), die mit 1 x TAE-Puffer gefüllt war, mit den vorbereiteten Proben (5µl des PCR-Produktes und 3µl 0,01%- igem Bromphenolblau-Probenpuffer) beladen. Außerdem führten wir stets einen DNA-Längenstandard mit. Bei einer Spannung von 70 Volt ließen wir die Proben so lange im Gel laufen, bis die Größe des amplifizierten Fragmentes dem Längenstandard zugeordnet werden konnte. Die Amplifikate wurden auf einem Transilluminator (320 nm, Stratagene) durch das im DNA-Doppelstrang interkalierende und unter UV-Strahlung fluoreszierende Ethidiumbromid sichtbar gemacht und durch ein Foto dokumentiert. Die Auswahl der spezifischen Amplifikate, die in Sequenzierungsreaktionen Einsatz fanden, ist in Tabelle 6 zusammengefaßt.

- *Allelspezifische Oligonukleotid-Hybridisierung (ASO)*

Die ASO wurde zur Untersuchung von Punktmutationen in *CYP21* in Anlehnung an die von Helmborg et al. (1992) publizierte Vorschrift durchgeführt.

CYP21-Spezifische Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Computerprogramms Oligo 4.0 (Primer analysis software, copyright 1989-1991, Wojciech Rychik) ausgewählt.

Die radioaktive Markierung des Primers erfolgte durch 5'-Phosphorylierung mit Hilfe von [γ -³³P]-dATP. Dabei wurde in einer durch das Enzym T4-Polynukleotid-Kinase katalysierten Reaktion die γ -³³P-Phosphatgruppe der ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe des Oligonukleotides übertragen.

Markierungsansatz:

0,25 µl	Primer (50µM)
1 µl	T4-Kinase (10U/µl)
1 µl	10x Kinasebuffer
2,5 µl	[γ ³³ P]-dATP
ad.	10µl Aqua bidest

Der Ansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Enzyminaktivierung für 10 min bei 95°C. Der kinasierte Primer wurde bis zu seinem Einsatz in der Hybridisierung bei -20°C gelagert.

Die PCR-Produkte wurden auf einen Nylonmembran-Filter transferiert und mit den radioaktiv markierten spezifischen Oligonukleotiden für *CYP21P* und *CYP21* hybridisiert. Die Filter wurden danach zusammen mit Verstärkerfolien und einem Röntgenfilm in eine Röntgenkassette gelegt und bei Raumtemperatur exponiert. Die Belichtungszeit variierte je nach Signalstärke zwischen 1 und 14 Tagen. Die Filmentwicklung erfolgte anschließend in einer automatischen Entwicklungsapparatur (Agfa).

Nach der anschließenden Autoradiographie erfolgte die Auswertung auf dem Phospho Imager mit einem Computerprogramm (Fujix. Bas 2000, TINA 2,09).

Tabelle 7: Auswahl der verwendeten sense (s)- und antisense (as)- Primer für *CYP21*.
 Hyb: Hybridisierungstemperatur, WT: Wildtyp, Mut: Mutation, seq: Sequenzierung, spln2: Splice-Site-Mutation

Oligonukleotide	Sequenzen 5'-----3'	Einsatz	Mutation
264b (s)	CCTGTCCTTGGGAGACTAT	PCR, seq.	5' primer exon 3
263b(as)	GAGACTACTCCCTGCTCTG	PCR, seq.	3' primer exon 3
304 (s)	GAAGAAGGTCAGGCCCTC	Seq.	spl. Intron 2
276 (s)	GGGGCTCTTGAGCTATAAGTGG	PCR, seq.	TATA-box
274 (as)	TCCTTGGGAGACTACTCCT	PCR, seq.	3' primer exon 3
5 (s)	TCCTTGGGAGACTACTCCT	Hyb, 56°C	5' primer exon 3 Δ 8bp
287 (s)	CTGCAGACAAGCTGGTGT	PCR	5' primer exon 3
288 (as)	GAGCAGCTGACCCAGGAG	PCR	3' primer exon 3
260 (s)	AGAACTACCCGGACCTGT	PCR	5' primer exon 3
261 (as)	TTCTGTGAGGTAAGGCTG	PCR	3' primer exon 3
155 (as)	CCAGCCGGGTACCTCAGTT	PCR	3' primer, 3' Region
111 (s)	CCACCTCCCGCCTCTTG	Hyb, 63°C	<i>CYP21</i> , P30L
112 (s)	CCACCTCCTGCCTCTTG	Hyb, 63°C	<i>CYP21P</i> , P30L
62 (s)	AGCCCCCACTCCTCCT	Hyb, 63°C	<i>CYP21</i> , spln2
67 (s)	AGCCCCCACTCCTCCT	Hyb, 66°C	<i>CYP21</i> , spln2
57 (s)	AGCCCCCACTCCTCCT	Hyb, 65°C	<i>CYP21P</i> , spl. Intron 2
121 (s)	CTGTCGTTGGTCTCTGCTC	Hyb, 60°C	<i>CYP21P</i> , Δ8bp
51 (s)	CAGCATCACTGTTAC	Hyb, 51°C	<i>CYP21</i> , I172N
52 (s)	CAGCATCACTGTTAC	Hyb, 50°C	<i>CYP21P</i> , I172N
29 (s)	GATCACATCGTGGAGATGCA	Hyb, 58°C	<i>CYP21</i> , cluster exon 6
120 (s)		Hyb, 62°C	<i>CYP21P</i> , cluster exon 6
63 (s)	AAGGGCACGTGCACATG	Hyb, 58°C	<i>CYP21</i> , V281L
58 (s)	AAGGGCACITGCACATG	Hyb, 59°C	<i>CYP21P</i> , V281L
206 (as)	CTGATCGGTGGCACTGA	Hyb, 58°C	<i>CYP21</i> , WT, G292S
140 (as)	TCCTGATCAGTGGCACT	Hyb, 60°C	<i>CYP21</i> , Mut., G292S
64 (s)	GTGGTTTTTTTGCTTC	Hyb, 60°C	<i>CYP21</i> , 1760insT
59 (s)	GTGGTTTTTTTGCTTC	Hyb, 57°C	<i>CYP21P</i> , 1760insT
65 (s)	AGCGACTGCAGGAGGAG	Hyb, 60°C	<i>CYP21</i> , Q318X
60 (s)	AGCGACTGTAGGAGGAG	Hyb, 62°C	<i>CYP21P</i> , Q318X
205 (s)	TACAAGGACCGTGCAC	Hyb, 57°C	<i>CYP21</i> , WT, R339H
92 (s)	CAAGGACCATGCACGG	Hyb, 57°C	<i>CYP21</i> , Mut., R339H
207 (s)	GAGGTGCTGCGCCTGC	Hyb, 66,5°C	<i>CYP21</i> , R356W
208 (s)	GTGCTGCGCCTGTGG	Hyb, 63,5°C	<i>CYP21P</i> , R356W
216 (s)	CTTCACGCTGCTGCCCTC	Hyb, 64°C	<i>CYP21</i> , WT, P453S
215 (s)	CTTCACGCTGCTGICCTC	Hyb, 63°C	<i>CYP21</i> , Mut., P453S
218 (s)	CGGGGGATGGGGGC	Hyb, 57°C	<i>CYP21</i> , WT, 2675G/C
217 (s)	CCGGGATGGGGGC	Hyb, 57°C	<i>CYP21</i> , Mut., 2675G/C

Tabelle 8: Ausgewählte Sequenzierprimer. Nukleotidpositionen gemäß CYP21-Bank, M12792; M23280, V = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer

Primer	Sequenz (5'-3')	Position	Zweck	Punkt Mutation
P 7 R	CAA ggT ggA gcc TgT AgA Tg	1829-1849	Detektion v. 1767: C-T	Pro30Leu
P 8 V	Ccc Acc TcA gcc TcA AAg Tg	2170-2190	Detektion v. 2333: AA/AC-AG	12-Splice 8bpDel
P 9 R	Tac TTT cAg TTc Agg AcA A	2760-2779	Detektion v. 2677: T-A	Ile172Asn
P 10 V	GgA AgA ggg cTc Tgg AcA gc	3327-3347	Detektion v. 3361: G-T	Val281Leu
P 11 V	Ggc Tgc Tgg ggc Agg AcT	3620-3638	Detektion v. 3672: C-T	Gln318stop
P 12 R	Gcg gTg ggg cAA ggc TAA g	3801-3820	Detektion v. 3736: G-A Detektion v. 3786: C-T	Arg339HisArg356Trp
P 13 V	Tcc ccA ccc Acc TgT ccA c	4091-4110	Detektion v. 4256: C-T	Pro453Ser

• DNA-Sequenzierung

Zur Untersuchungen von Punktmutationen (Tabelle 5) wurden die Amplifikate (2.2.3.6.) mit dem Sequenzierkit von USB (United States Biochemical, USA) nach der enzymatischen Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) sequenziert. Mit diesem Kit kann doppelsträngige DNA direkt sequenziert werden. Durch ein radioaktiv markiertes Nukleotid (^{33}P - α -dATP) konnten die Fragmente auf einem Röntgenfilm (X-Omat AR von Kodak) sichtbar gemacht werden.

Ein Überblick über verwendete Reagenzien bei der Sequenzierungsreaktion ist in der Tabelle 9 wiedergegeben.

Enzymatische Vorbehandlung des PCR-Produktes:

Nach der Konzentrationsbestimmung des Amplifikates mittels Massenstandard (Promega) wurden ca. 4 -7 μl Exonuclease I (10 U) mit 1 μl Alkalischer Phosphatase (2 U, Shrimp Alkaline Phosphatase) versetzt und bei 37°C für 15 min inkubiert, um den Überschuß an dNTP und Primern zu beseitigen. Danach erfolgte zur Inaktivierung der Enzyme eine Inkubation der Proben für 15 min bei 80°C.

Annealing des Primers:

Zur eisgekühlten, vorbehandelten Probe wurden 5-10 pmol/ μl Primer hinzugefügt und Aqua bidestillata auf ein Volumen von 10 μl aufgefüllt. Nachdem die Probe gemischt und kurz zentrifugiert worden war, erfolgte die Denaturierung bei 100°C für 2-3 min. Danach wurde die Probe sofort für mindestens 5 min in Eiswasser gelagert, um das Annealing des Primers zu ermöglichen. Die ausgewählten Sequenzierprimer sind in Tabelle 3 dargestellt.

Markierungsreaktion (Labeling):

Zur eisgekühlten (annealten) Probe wurden 2 μl 5 x Reaktionspuffer (Reaction Buffer), 1 μl DTT, 2 μl 1 : 5 verdünnter Labeling Mix, 0,5 μl ^{33}P - α -dATP (NEN-Du Pont) und 2 μl Sequenase (3,2 U) hinzugefügt. Dann wurde die Mischung geschüttelt, zentrifugiert, 5 min lang bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend mit 1 μl Mangan-Puffer (Mn Buffer) versetzt. Mit der Sequenase (Version 2.0 DNA Polymerase, USB) werden durch Mangan eine bessere Bandenuniformität und das Lesen bis an den Primer heran erreicht.

Tabelle 9: Überblick über verwendete Reagenzien bei der Sequenzierungsreaktion

Reagenzien	Zusammensetzung und Konzentrationen
Exonuclease I	10 U/µl in 29 mM Tris-Salzsäure (pH-Wert 7,5), 5 mM 2-Mercaptoethanol, 50% Glycerol
Shrimp Alkaline Phosphatase	2 U/µl mM Tris-Salzsäure (pH-Wert 7,6), 1 mM Magnesiumchlorid, 0,1 mM Zinkchlorid, 50% Glycerol
Reaction Buffer	200 mM Tris-Salzsäure (pH-Wert 7,5), 100 mM Magnesiumchlorid, 250 mM Natriumchlorid
DTT	Dithiothreitol, 0,1 µM
Labeling Mix	7,5 M 7-deaza-dGTP, 7,5 µM dCTP, 7,5 µM dTTP
Sequenase	1,6 U/µl mit anorganischer Pyrophosphatase(2 U/µl) in 20 mM Tris-Salzsäure (pH-Wert 7,5), 2 mM Dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 50% Glycerol
Mangan Buffer	Mangan-Puffer, 0,15 Natriumisocitrat, 0,1 µM Manganchlorid
Stop Solution	95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol
Termination Mix	80µl dreier Deoxynukleotide, 80 µl des entsprechenden Didesoxynukleotids, 80 µM 7-deaza-dGTP und 50 mM Natriumchlorid

Kettenabbruchmethode:

Diese Methode beruht darauf, daß die Polymerisation der DNA *in vitro* an einem Einzelstrang immer dann abgebrochen wird, wenn die Elongation durch ein 2',3'-Dideoxy-nucleosid-5'-triphosphat (ddNTP) verhindert wird. Demgemäß wurden für eine Sequenzierung vier verschiedene Reaktionen mit jeweils einem anderen ddNTP durchgeführt. In die bereits mit einem entsprechenden Volumen von 2,5 µl Terminationsmix (ddA oder ddG oder ddT oder ddC) vorbereiteten und bei 37°C inkubierten Eppendorfgefäße wurden jeweils 3,5 µl der radioaktiv markierten Probe im gleichen zeitlichen Abstand hinzugegeben und danach für ca. 7 min inkubiert. Dann wurden 4 µl 2 x Stop-Lösung (Stop-Solution) stets im gleichen zeitlichen Abstand hinzupipettiert.

Sequenziergel:

Für die elektrophoretische Auftrennung der entstandenen Fragmente wurde ein 8%iges denaturierendes Polyacrylamidgel (s. Anhang) zwischen zwei vorbereitete, durch zwei 0,35 mm dicke Spacer getrennte Glasplatten (SA 60, Life technologies) gegossen, die durch ein Klebeband abgedichtet und mit einem Haifischkamm versehen waren. Die Glasplatten waren vorher mit Spülmittel, Aqua bidestillata und Ethanol gereinigt worden. Dann wurde die größere der beiden Platten mit einem Gemisch aus 5 ml 100%igem Ethanol, 175 ml 10%iger Essigsäure und 10 µl Haftsilan (Merck) benetzt und 5 min danach mit Aqua bidestillata und Ethanol abgerieben. Die andere Platte wurde mit 5 ml Gel-Slick (AT Biochem) benetzt und nach 5 min mit Aqua bidestillata poliert.

Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer (Gibco BRL) eingespannt und bei 70-80 Watt und maximal 3000 Volt auf ca. 50°C vorgeheizt, wobei als Puffer der 20 x Glycerol-Tolerant-Puffer (1 : 50 verdünnt, USB) Verwendung fand. Dann wurden 2,5 - 3 µl der vier Nukleotidgemische bei 70 - 80°C denaturiert und parallel aufgetragen (meist ACGT von links nach rechts). Der Elektrophoreselauf wurde bei 70 - 80°C gestartet. Anhand des Farbstoffes Xylencyanol konnte abgeschätzt werden, wie weit die Proben im Gel gelaufen waren.

Nach der Elektrophorese wurden die Platten voneinander getrennt, wobei die Platte mit dem darauf haftenden Sequenziergel für 20 min in 10%iger Essigsäure fixiert und sodann in Aqua bidestillata gewaschen wurde. Anschließend erfolgte das Trocknen des Gels bei 75°C für eine Dauer von 30 min. Zuletzt wurde es in einer Röntgenfilmkassette (Rego) unter einem Film (X-Omat) platziert, wobei der Film mindestens 12 Stunden exponiert wurde. Nach dem Entwickeln des Filmes konnte die Sequenz des PCR-Produktes direkt abgelesen werden.

- **Fluoreszenz -In Situ- Hybridisierung (FISH) und Chromosomenuntersuchung**

Der Anlaß für die konventionelle Chromosomenanalyse und die FISH-Analyse war der Nachweis einer Translokation [t(2;10)(q13;q26)] bei zwei Schwestern mit PCOS (persönliche Mitteilung: Jutta Wirth, Max-Planck Institut, Berlin-Dahlem) wurden deshalb die PCOS-Patienten unserer Stichprobe daraufhin untersucht. Bei den Männern mit idiopathischer Oligospermie gehörte die Chromosomenanalyse zur klinischen Diagnostik der behandelnden Einrichtung. Bei den AGS-Patienten wurde auf eine Chromosomenanalyse verzichtet.

Das Ziel war, eine weitere Patientin mit der Translokation mit einem der beiden Bruchpunkte erfassen zu können.

Die Sonde für die FISH-Analyse (10q26: 3 cM) wurde vom Max-Planck-Institut zur Verfügung gestellt. Diese Untersuchungen wurden mit Zustimmung der Patientinnen durchgeführt.

300 - 500 ng Proben-DNA (YAC-Sonde 972a1) wurden mit Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer-Mannheim) über Nick-Translation (Sambrook et al. 1989) markiert. Die CISS- (Chromosomen-*in situ*-Suppressions-) Hybridisierung wurde nach Protokoll von Lichter et al. (1988) unter Zugabe von 50 µg Cot 1-DNA- (Boehringer Mannheim), Kaninchen-anti-Maus-IgG-FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) und Ziege-anti-Kaninchen-IgG-FITC (beide von Sigma) nach dem Protokoll von Pinkel et al. (1988) durchgeführt. Die Gegenfärbung der Metaphasechromosomen erfolgte mit Propidiumjodid (rot) und 4,6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (blau). Die Präparate wurden in 90% Glycerin- 0,1% Phenylendiamin-Gemisch eingebettet. Zur Auswertung benutzten wir ein ZEISS Axiophot-Fluoreszenzmikroskop. Die Bilder wurden mit Hilfe einer digitalen hochauflösenden Kamera (Nu 200, Photometrics) unter Verwendung der SmartCapture™ FISH-Software (Vysis GmbH, Stuttgart) aufgenommen.

- **Hormonanalytische Untersuchungen**

- **Vorbemerkung:**

Vor den molekulargenetischen Untersuchungen wurden bei den Stichproben mit PCOS und idiopathischer Oligospermie zunächst die hormonanalytischen Befunde mit Hilfe des ACTH-Tests erhoben.

- **21-OH-Defizienz**

Hinweise auf Funktionsstörungen der NNR können durch Anregung mit intravenös injiziertem synthetischen ACTH und Messung von Hormonparametern im Blutplasma erhalten werden. Spezifische Enzymdefizienzen sind durch den Konzentrationsanstieg von Zwischenstufen der Steroidsynthese in einer nach dem Test gewonnenen Blutprobe über den als normal geltenden Bereich gekennzeichnet. Basis für die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen hormonanalytischen Hinweise auf partielle Defizienzen des adrenalen Enzyms 21-OH ist die Messung von 21-DOF-Konzentrationen in Blutplasma nach ACTH-Injektion.

Die Analyse von Steroid- und Peptidhormonen erfolgte in Laboratorien des Institutes für Experimentelle Endokrinologie des Universitätsklinikums Charité der Humboldt-Universität zu Berlin. Tabelle 10 gibt die im Plasma oder Serum gefundenen Hormonwerte mit den dabei zur Anwendung gekommenen Verfahren und den gültigen Referenzwerten in SI-Einheiten wieder.

Um der Tagesrhythmik der Kortisolsekretion für die Untersuchungen relevanter Steroidhormone Rechnung zu tragen, war es notwendig, zuvor festgelegte Standardbedingungen einzuhalten. So mußten alle ACTH-Tests vormittags zwischen 7.30 und 11.00 Uhr erfolgen.

Die Patienten wurden über Vorgehensweise, Zweck und mögliche Nebenwirkungen der Untersuchung aufgeklärt und gaben mit ihrer Unterschrift die Zustimmung zur Durchführung und anonymen wissenschaftlichen Auswertung der Ergebnisse. Vor den Blutentnahmen wurden die Patienten gebeten, sich mindestens 10 Minuten auf einer Untersuchungsliege auszuruhen. So sollte ein streßbedingter Anstieg des Cortisols möglichst gering gehalten werden. Der Entnahme von Cubitalvenenblut in Monovetten der Fa. SARSTEDT schloß sich die langsame, intravenöse Injektion eines Gemisches aus 0,25 mg Synacthen® und 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung (Synacthen® der Fa. CIBA PHARMA, Wirkstoff: Tetracos-actid-hexaacetat-synthetisches Polypeptid mit ACTH-

Wirkung) an. Eine Stunde post injectionem erfolgte nochmals eine Venenblutentnahme. Zur Plasma- (heparinisierte Monovetten) bzw. Serumgewinnung (Monovetten ohne Zusätze) wurden die Blutproben zentrifugiert. Plasma und Serum wurden bei -20 bis -25 °C aufbewahrt.

- hormonanalytische Charakterisierung

Neben der Konzentrationsbestimmung von 21-DOF wurden Kortisolkonzentration nach dem ACTH-Test gemessen und das Verhältnis von 21-DOF zu Kortisol (F) nach dem ACTH-Test errechnet.

$$Q_1 = \frac{21-DOF_T}{F_T}$$

T = 60 min nach 0,25 mg ACTH (1-24) i.v.

Die Verwendung von Q_1 ist sinnvoll, weil bei einer vorliegenden 21-OH-Defizienz von einem im Vergleich zum 21-DOF-Anstieg schwächeren Anstieg des Kortisols im ACTH-Test ausgegangen werden muß und somit durch die Bildung eines Quotienten der Posttestwert aus beiden Parametern eine bessere Diskriminierung zwischen Normalwerten und Werten, die auf eine Enzymdefizienz hinweisen, möglich ist.

Durch Anwendung dieses Quotienten erhielt Dörner (1991) Hinweise auf eine partielle 21-OH-Defizienz.

- 3β HSD-Defizienz

Erhöhte Basalwerte für DHEAS gelten als Marker für nichtklassische bzw. partielle 3β-HSD-Defizienzen (Bongiovanni, 1962). Zusätzlich wurde der Quotient:

$$Q_2 = \frac{DHEAS_b}{F_b} \quad \text{ausgewertet.}$$

b = Basalwert

Psychischer Dauerstreß und andere Einflüsse können infolge der Anregung der NNR-Funktion zu erhöhten Werten für DHEAS und damit zu falsch positiven Hinweisen auf eine 3β-HSD-Defizienz führen. Durch Verwendung von basalen Kortisolwerten in Q_2 , die bei psychischem Streß erhöht sind, werden falsch positive Hinweise auf eine 3β-HSD-Defizienz eliminiert.

Wie einleitend beschrieben, liegt die 3β-HSD in Form von zwei Isoenzymen-TypI und TypII- vor. Die bisher beschriebenen Defizienzen des Enzyms betreffen immer die adrenal/gonadal wirksame 3β-HSD-TypII, so daß ein Teil des in der NNR überproduzierten DHEA peripher durch die 3β-HSD-TypI zu Androstendion umgesetzt wird. Für Androstendion können deshalb trotz einer partiellen 3β-HSD-Defizienz normale oder sogar erhöhte Konzentrationen gefunden werden, so daß eine Quotientenbildung aus DHEAS und Androstendion zur Diagnostik der 3β-HSD-Defizienz nicht sinnvoll wäre.

Tabelle 10: Art und Methoden der in Laboren der Charité durchgeführten Hormonalysen mit entsprechenden Referenzwerten (* vor ACTH, **vor und nach ACTH). Die Konzentrationen der Steroidhormone: F, 21-DOF, A, DHEA und DHEAS wurden mit laborinternen Methoden des Institutes für Experimentelle Endokrinologie der Charité bestimmt.

Hormone	Bestimmungsmethoden	Referenzwerte (basal)
Cortisol**	Kompetitive Proteinbindungsmethode	140-500 nmol/l
17 α -OHP**	125J RAA Kit (ImmuChem,ICN Biomedicals)	0,9-6,5 nmol/l
21-DOF**	Extraktion Säulenchromatographie an Celit, RIA	2,6-5,8 nmol/l
Androstendion*	Extraktion, Säulenchromatographie an Celit, RIA	2,6-5,,8 nmol/l
DHEA*	Extraktion, RIA	8-44 nmol/l
DHEAS*	Solvolyse, Extraktion,RIA	2,3-8 μ mol/l
Testosteron*	Enzymimmunassay mit Magnettrenntechnik (Serono)	9-35 nmol/l
LH*	Immunenzymometrischer Assay mit Magnettrenntechnik (Serono)	1,5-10 mIU/ml
FSH*	Immunenzymometrischer Assay mit Magnettrenntechnik (Serono)	1-14 mIU/ml

- Statistische Auswertung der Ergebnisse der Hormonalysen

Die untersuchten Probandengruppen (PCOS und idiopathische Oligospermie, weibliche sowie männliche Kontrollen) stellten unabhängige Stichprobenkollektive dar.

Als Normalbereich wurde der Mittelwert \pm 2SD der Kontrollen gewertet. Die Steroidkonzentrationswerte der Probanden wurden mit dem Normalbereich der Kontrollgruppen zur Feststellung einer Enzymdefizienz verglichen. Einzelwerte von Kontrollpersonen, die bedeutend höher oder niedriger als der Normalbereich ($>>$ MW + 2SD oder $<<$ MW - 2SD) erschienen, wurden mit dem Dixon-Ausreißer-Test geprüft und nicht in die Berechnung einbezogen, wenn der Wert ein Ausreißer war.

Ergebnisse

• Mutationen bei den Patienten mit AGS

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse der AGS-Stichprobe sind in Tabelle 10 zusammengefaßt. Mit Hilfe der PCR und der ASO untersuchten wir die DNA von 62 AGS-Patienten auf 14 verschiedene, häufig auftretende Mutationen und fanden diese auf 110 von 124 Allelen. Mehr als 60% der Patienten waren Compound-Heterozygote. Es waren 30 *CYP21*-Deletionen/Konversionen, 3 Basensubstitutionen P30L im Exon 1, 30 Splice-Site-Mutationen SplIn2, 26 Missense-Mutationen I172N im Exon 4, 1 Mutationscluster I236N, V237E, M239K im Exon 6, 8 Mutationen V281L und 1760-1761insT im Exon 7, 8 Nonsense-Mutationen Q318X im Exon 8 sowie 4 Missense-Mutationen R356W im Exon 8 nachweisbar. In 14 Allelen (11%) wurden keine Mutationen gefunden. Diese Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit der endokrinologischen Arbeitsgruppe veröffentlicht (Kapelari et al. 1999).

Tabelle 11: Verteilung der die Krankheit verursachenden Allele bei den kaukasischen Patienten mit 21-OH-Defizienz in der AGS-Studie (n = 62).

Mutation	Anzahl der gefundenen Allele	Anzahl der Allele bei Patienten mit SVS	Anzahl der Allele bei Patienten mit SV	Anzahl der Allele bei Patienten mit LO	Häufigkeit der Mutationen (in %)
Deletion/ Konversion	30	24	4	2	24
P30L	3		3		2,4
Spl In2	30	27	3		24
I172N	26	9	16	1	20,9
V281L	7	2	3	2	5,8
G292S	0				
L307F	1	1			0,8
Q318X	8	6	2		6,4
R339H	0				
R356W	4	4			3,2
P453S	0				
L484F	0				
keine Mutation	14				11,3

Tabelle 12: Beispiele für die gefundene Genotyp-Phänotyp-Korrelation in der AGS-Studie. **SVS**: Patienten mit Salzverlustsyndrom, **SV**: Patienten mit leicht virilisierender Form LO: Patienten mit late onset

		1. Allel						
	Mutation in CYP21	Deletion/ Konversion	P30L	SpIn 2	I172N	V281L	Q318 X	R356W
2. Allel	Deletion und Konversion	1,16,25,40,52						
	P30L	<u>60,62,36</u>						
	SpIn 2	12,13,18,27,41		6,7,15,19 ,26,30,50 , 53,59,61				
	I172N	38,4,42,54 ,9		<u>33,39,45, 51,46</u>	10,2, 14,21, 44, 56, 34			
	V281L	17,48			<u>35,47,57, 37,49</u>			
	Q318X	8,11,5,28			24,22		<u>29</u>	
	R356W							43,55

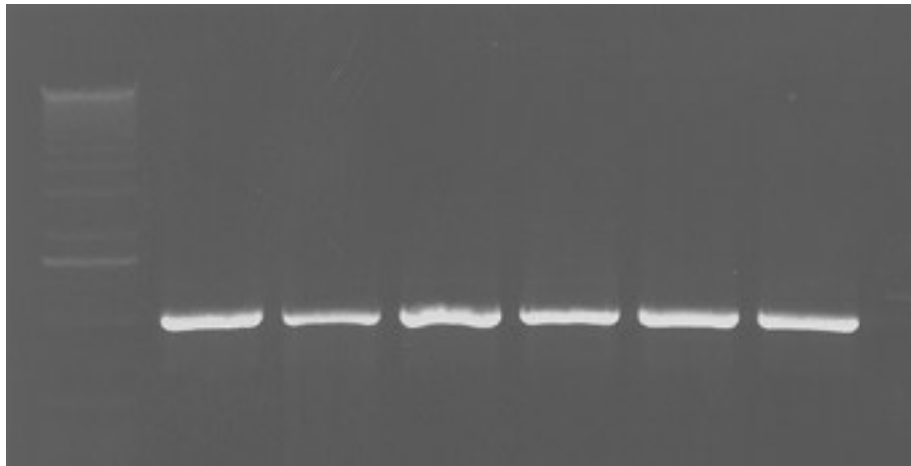


Abbildung 6: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkt Nr. I
(1000 bp)

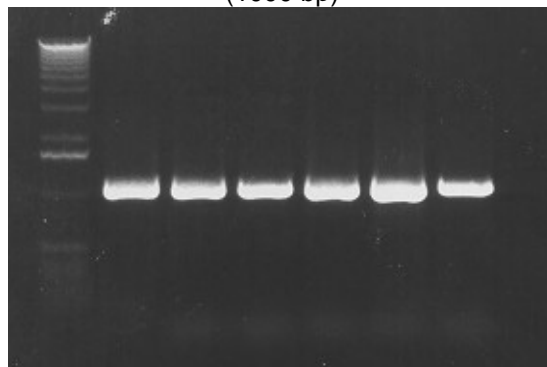


Abbildung 7: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkt Nr. II
(1000 bp)

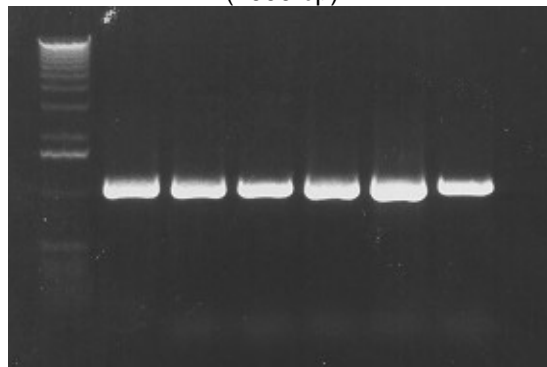


Abbildung 8: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkt Nr. III
(2000 bp)

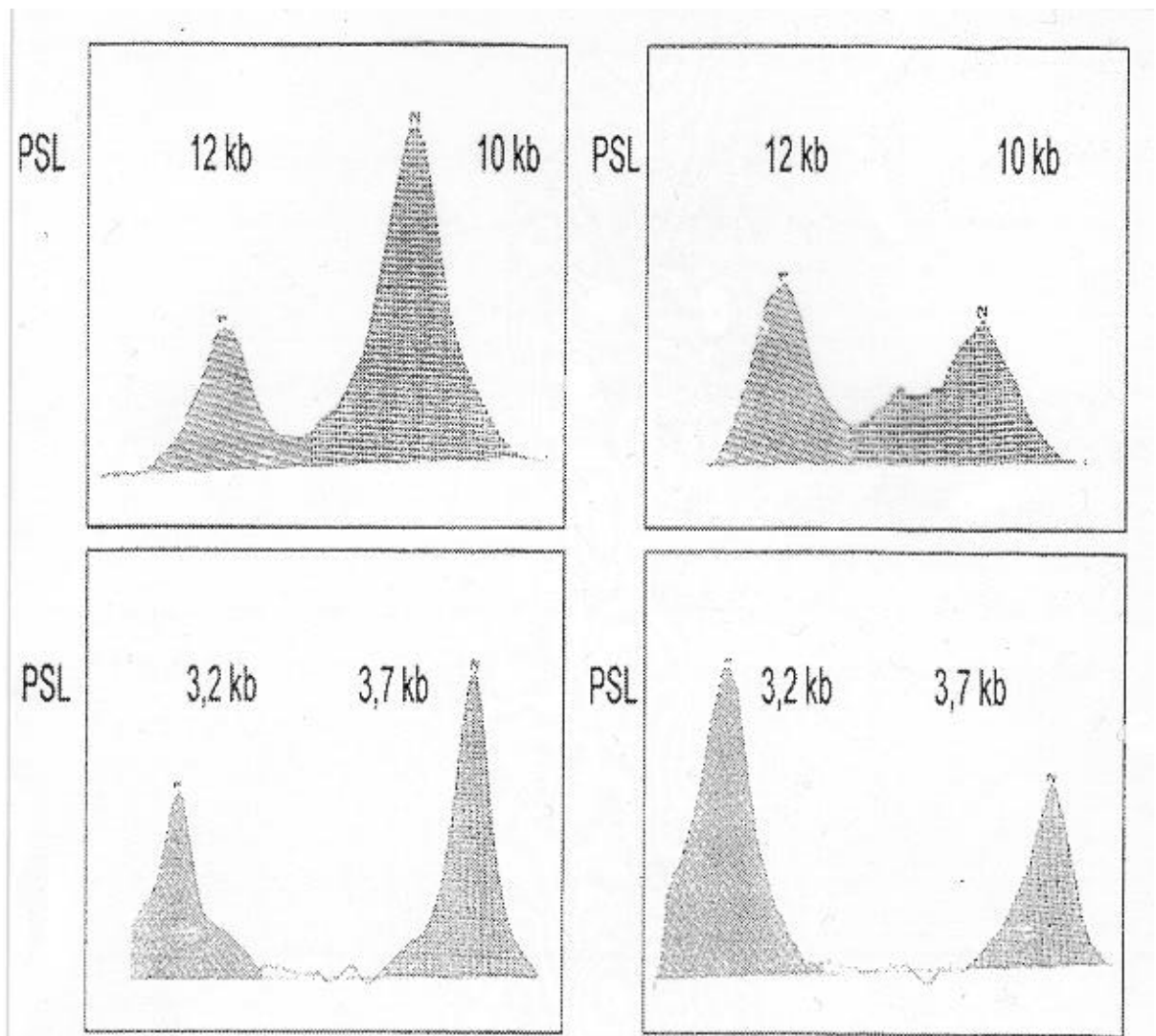


Abbildung 9 Schematische Darstellung der 30kb-Deletionen (links) und Genkonversionen (rechts) in *CYP21*. Die genomische DNA wurde nach der Spaltung mit Restriktionsenzymen *Taq I* (3,2kb bzw. 3,7kb) und *BglII* (10kb bzw. 12kb) unter Einsatz einer p21a/3c-Sonde hybridisiert. Die Auswertung erfolgte mittels Phospho-Imager mit dem Computerprogramm TINA Version 2.09 (Fuji X, Bas 2000). Signale für 30kb-Deletion (links): *BglII*: 10kb: 12kb = 2 : 1 und *TaqI* :3,2kb: 3,7kb = 2 : 1. Signale für Genkonversionen (rechts): *BglII*: 10kb : 12kb = 1 : 1 und *TaqI*:3,2kb : 3,7kb = 3 : 1 (PSL: photostimulated luminescence).



Abbildung 10 Autoradiogramm und Schematische Darstellung der Mutationsanalyse der 8-bp-Deletion im Exon 3 des *CYP21* bei Patienten mit AGS.

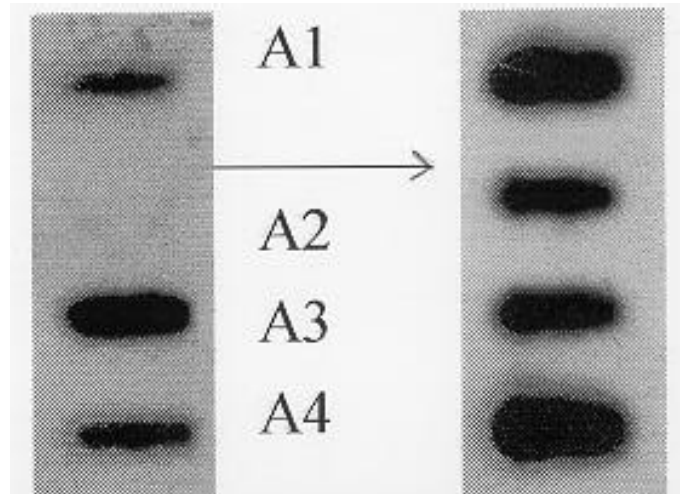


Abbildung 11: Autoradiogramm der ASO-Hybridisierung von Exon 1 mit P30L Mutation bei einer AGS-Patientin mit nichtklassischer Form (late onset)

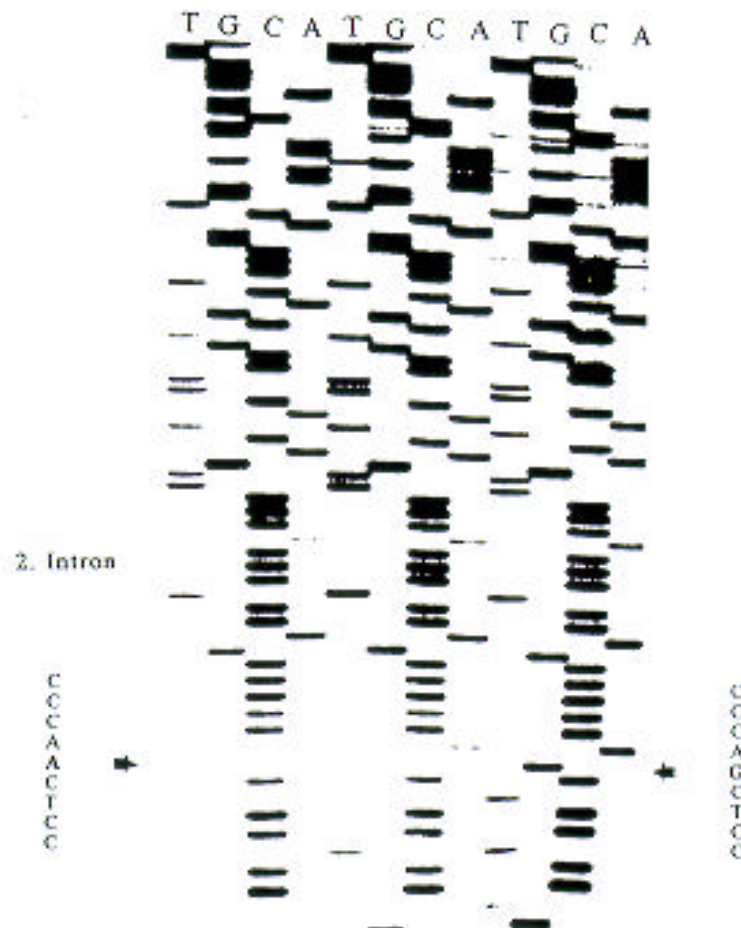


Abbildung 12: Ausschnitt aus *CYP21* aus der Sequenzanalyse PCR II. Mit P8 als Sequenzierprimer detektierte Splice-Mutation bei einem Patient mit idiopatischer Oligospermie. Die Pfeile kennzeichnen die Punktmutation.

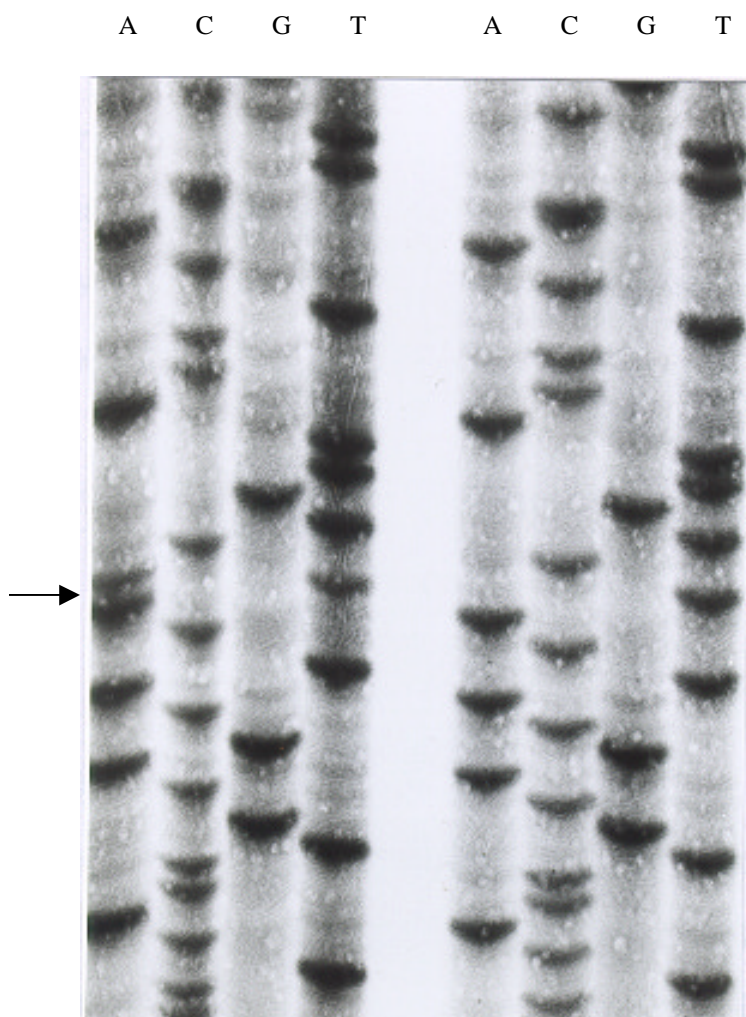


Abbildung 13: Ausschnitt aus *CYP21* (Exon 4).
Sequenzanalyse PCR II mit P 10 als
Sequenzierprimer. Mutation Ile172Asn. Der Pfeil
kennzeichnet die Punktmutation.

- **Ergebnisse der Untersuchungen bei der PCOS-Stichprobe**

- **Molekulargenetische Befunde**

Zur Übersicht sind in Tabelle 13 die wichtigsten klinischen Befunde und die molekulargenetischen Untersuchungsergebnisse zusammengefaßt. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse des Mutationsscreenings in *CYP21* bei 21 PCOS-Patientinnen. Neben den wichtigsten klinischen Befunden wurden das Alter, der BMI und der Quotient von LH/FSH der Patientinnen angegeben.

Wie aus Tabelle 13 ersichtlich, wurden bei vier PCOS-Patientinnen der Stichprobe 5 Punktmutationen nachgewiesen: Drei Splice-Site-Mutationen Spl2 im intron 2 und zwei I172N-Mutationen im Exon 4.

Die Ergebnisse des Mutationsscreenings von *CYP21* für häufige und relevante Mutationen stimmten mit den hormonanalytischen Befunden überein.

- **Hormonanalysen**

- partielle 21-OH-Defizienzen

Hinweise auf partielle 21-OH-Defizienzen stützen sich vorwiegend auf die Auswertung der Steroidkonzentrationsmessungen von 17α -OHP, 21-DOF im Blutplasma nach ACTH-Test und dem daraus berechneten Quotienten 21-DOF/F (Q_1).

Als hormonanalytisch auffällig für eine partielle 21-OH-Defizienz wurden alle Patienten und Kontrollpersonen gewertet, bei denen die Parameter 21-DOF und/oder 21-DOF/F nach ACTH $> MW + 2SD$ der jeweiligen Kontrollgruppe war. Aufgrund der Unsicherheit der Aussagekraft von 17α -OHP-Werten (s. Tabelle 14) wurde die Nachweisgrenze für 21-

OH-Defizienzen bei diesem Kriterium auf $>MW+3SD$ festgelegt. Wie aus Tabelle 16 ersichtlich, wurden erhöhte Werte der o.g. Parameter nach ACTH-Test mit Hinweis auf partielle 21-OH-Defizienz bei vier PCOS-Patientinnen gefunden.

- partielle 3β -HSD- Defizienzen

Hinweise auf partielle 3β -HSD-Defizienz wurden durch die Auswertung der Steroid-Konzentrationsmessungen von DHEAS basal und Kortisol basal im Blutplasma und den aus diesen Meßgrößen berechneten Parametern DHEAS/F (Q_2) ermittelt.

Nach der Auswertung der Hormonparameter konnten im Blutplasma erhöhte Werte für DHEAS und/oder DHEAS/F bei 12 PCOS-Patientinnen nachgewiesen werden.

Positiv wurden die Patientinnen gewertet, bei denen ein Wert $> MW+2SD$ der Kontrollen war. Davon hatten jedoch drei Patientinnen eine 21-OH-Defizienz, wodurch die erhöhten DHEAS-Werte erklärbar sind. Demzufolge hatten 9 der 21-Patientinnen eine partielle 3β -HSD-Defizienz.

Alle zur Berechnung der Größen Q_1 , Q_2 und Q_3 benötigten Daten sind in den Tabellen 13, 14 und 15 dargestellt.

Zwischen den Patienten- und der jeweiligen Kontrollgruppe bestanden keine signifikanten Unterschiede des Altersdurchschnitts.

Tabelle 13: die wichtigsten klinischen Befunde und Ergebnisse der Mutationsanalyse des CYP21 bei den PCOS-Patientinnen.

Patient	Alter	BMI	Klinische Befunde	LH / FSH	Mutationen
1	32	23	Oligomenorrhoe, Sekundäre Sterilität	0,8	-
2	35	25	Sekundäre Sterilität, Hirsutismus	2,4	-
3	35	26	Oligomenorrhoe, Hyperandrogenämie	2,3	-
4	18	24	Sekundäre Amenorrhoe, Hirsutismus, Hyperandrogenämie	0,8	-
5	39	29	Sekundäre Amenorrhoe, Hirsutismus	1,7	-
6	21	31	Sekundäre Sterilität, Hyperandrogenämie	2,1	Sp11n2, I172N
7	34	27	Sekundäre Amenorrhoe, Hirsutismus	1,3	-
8	36	24	Sekundäre Amenorrhoe, Hirsutismus, Hyperandrogenämie	1,3	-
9	39	21	Sekundäre Sterilität, Hyperandrogenämie	2,3	-
10	28	33	Oligomenorrhoe	2,5	I172N
11	39	26	Sekundäre Sterilität, Hyperandrogenämie	2,1	Sp11n2
12	33	22	Sekundäre Sterilität, Hirsutismus, Hyperandrogenämie	0,8	-
13	30	21	Oligomenorrhoe, Hirsutismus, Hyperandrogenämie	2,3	-
14	38	27	Sekundäre Amenorrhoe, Hyperandrogenämie	0,6	-
15	22	24	Sekundäre Amenorrhoe, Akne, Hyperandrogenämie	1,4	-
16	28	24	Sekundäre Amenorrhoe, Hyperandrogenämie	2,5	-
17	29	29	Primäre Sterilität, Hyperandrogenämie	1,7	-
18	30	23	Oligomenorrhoe, Akne, Hirsutismus, Hyperandrogenämie	3,0	-
19	21	29	Sekundäre Sterilität, Hyperandrogenämie	1,6	-
20	34	27	Sekundäre Amenorrhoe, Hyperandrogenämie	1,3	Sp11n2
21	22	24	Sekundäre Amenorrhoe, Hirsutismus, Hyperandrogenämie	0,7	-

Tabelle 14: Basal- und ACTH-stimulierte Werte der PCOS-Patientinnen für 21-DOF, F, 17-OHP und errechneten $Q_1 = 100 \times 21\text{-DOF}_T / F_T$, T = nach ACTH-Test mit MW sowie SD der Kontrollgruppe, als Hinweise auf 21-OH-Defizienzen; *) > MW + 1SD, **) > MW + 2SD, ***) > MW + 3SD

Nr.	F nmol/l basal	F nmol/l Test	21-DOF nmol/l basal	21- DOF nmol/l Test	Q_1	17 α -OHP nmol/l basal	17 α - OHP nmol/l Test
Kontrollgruppe:							
MW	259	742	0,28	0,99	0,131	3,09	7,01
SD	94	144	0,09	0,26	0,037	2,09	3,65
MW+2 SD	447	1130	0,46	1,51	0,205	7,27	14,30
Probandinnen:							
1	242	477	0,1	0,59	0,13	1,7	3,9
2	402	639	0,22	0,89	0,14	9,1	13,0
3	448	786	0,38	1,12	0,14	5,2	8,4
4	204	686	0,33	0,53	0,08	8,1	14,9**
5	412	715	0,14	0,96	0,14	3,2	8,1
6	475	1306	0,19	1,09	0,08	7,1	21,5***
7	230	820	0,21	0,26	0,04	2,5	6,7
8	742	1278	0,13	0,41	0,03	7,7	8,8
9	773	1380	0,38	0,82	0,06	6,3	10,4
10	493	856	0,10	3,12***	0,37**	1,9	7,5
11	340	848	0,17	1,68**	0,20*	4,4	5,9
12	169	951	0,13	0,53	0,06	4,0	9,7
13	354	599	0,13	0,39	0,07	2,5	3,5
14	181	881	0,01	0,37	0,04	2,3	8,5
15	214	1200	0,01	0,37	0,03	1,3	6,0
16	230	670	0,16	0,40	0,06	2,9	6,3
17	452	984	0,12	0,40	0,04	8,1	14,6**
18	388	769	0,14	0,32	0,04	4,7	6,6
19	395	649	0,5	0,7	0,11	7,0	9,0
20	415	1358	0,69	2,5***	0,18*	3,5	18,2***
21	189	904	0,03	0,56	0,06	2,3	8,7

Tabelle 15: Meßwerte für DHEAS, A basal und nach ACTH-Test und ermittelte Quotienten $Q_2 = \text{DHEAS}_b / F_b$, bei Patientinnen mit PCOS mit MW und SD der Kontrollgruppe, als Hinweise auf partielle 3 β -HSD-Defizienzen
 *) > MW + 1SD, **) > MW + 2SD, ***) > MW + 3SD

Nr.	F nmol/l basal	DHEAS μ mol/l basal	Q_2	A nmol/l basal	
Kontrollgruppe:					
MW	308	3,7	13,3	3,3	
SD	92	1,5	6,8	1,2	
MW +2 SD	492	6,7	26,9	5,7	
Probandinnen:					
1	242	3,36	13,90	5,5	
2	402	12,90***	32,20**	11,3	
3	448	6,51	14,53	11,0	
4	204	8,10**	39,70***	15,2	
5	412	6,50	15,77	21,5	
6	475	9,20***	19,36	14,4	21-OHD
7	230	3,39	14,47	7,2	
8	742	11,90***	16,04	29,3	
9	773	5,50	7,12	15	
10	493	5,10	10,35	7,7	21-OHD
11	340	12,80***	37,65***	12,0	21-OHD
12	169	12,75***	75,44***	9,9	
13	354	16,25***	45,90***	14,6	
14	181	2,68	14,80	5,8	
15	214	5,26	24,60	3,9	
16	230	10,10***	44,00***	6,1	
17	452	3,91	8,65	11,9	
18	388	11,90**	30,67**	16,1	
19	395	7,35**	18,60	15,4	
20	415	9,82***	23,70	22,4	21-OHD
21	189	23,80***	125,92***	6,9	

- **Konventionelle Chromosomenanalysen und FISH- Analyse bei der PCOS-Stichprobe**

- Vorbemerkung

- Für die FISH-Diagnostik zur Untersuchung der Translokation [t(2;10)(q13;q26)] stand nur die Sonde (YAC-972a1) für die fragliche Region im Chromosom 10, aber keine Sonde für das Chromosom 2 zur Verfügung.

- Die Chromosomenpräparate wurden bei allen Patientinnen nach GTG-Bänderung bei einer Auflösung von ca. 450 Banden im haploiden Chromosomensatz analysiert.

- Der Karyotyp war bei allen Patientinnen unauffällig.

- Mikrodeletionen bzw. kryptische Translokationen (Translokation gleich großer Abschnitte mit sehr ähnlicher Struktur) sind mit der konventionellen Chromosomenanalyse nicht nachweisbar.

- Um auch diese Art von chromosomalen Aberrationen erfassen zu können, wurde eine FISH-Analyse mit der YAC-Sonde (972a1) durchgeführt (2.6.)

- Das Ergebnis der FISH-Analyse zeigt, daß mit Chromosomen- und FISH-Analyse bei keiner Patientin eine Translokation mit Bruchpunkt im Chromosom 2 oder im Chromosom 10 nachgewiesen wurde.

- Hinweise auf eine andere Chromosomenaberration ergaben sich ebenfalls nicht.

- Da nur ein sehr geringer Prozentsatz aller Genmutation durch Translokationen verursacht wird, war die Aussicht, eine Translokation mit gleichem Bruchpunkt zu finden, sehr gering.

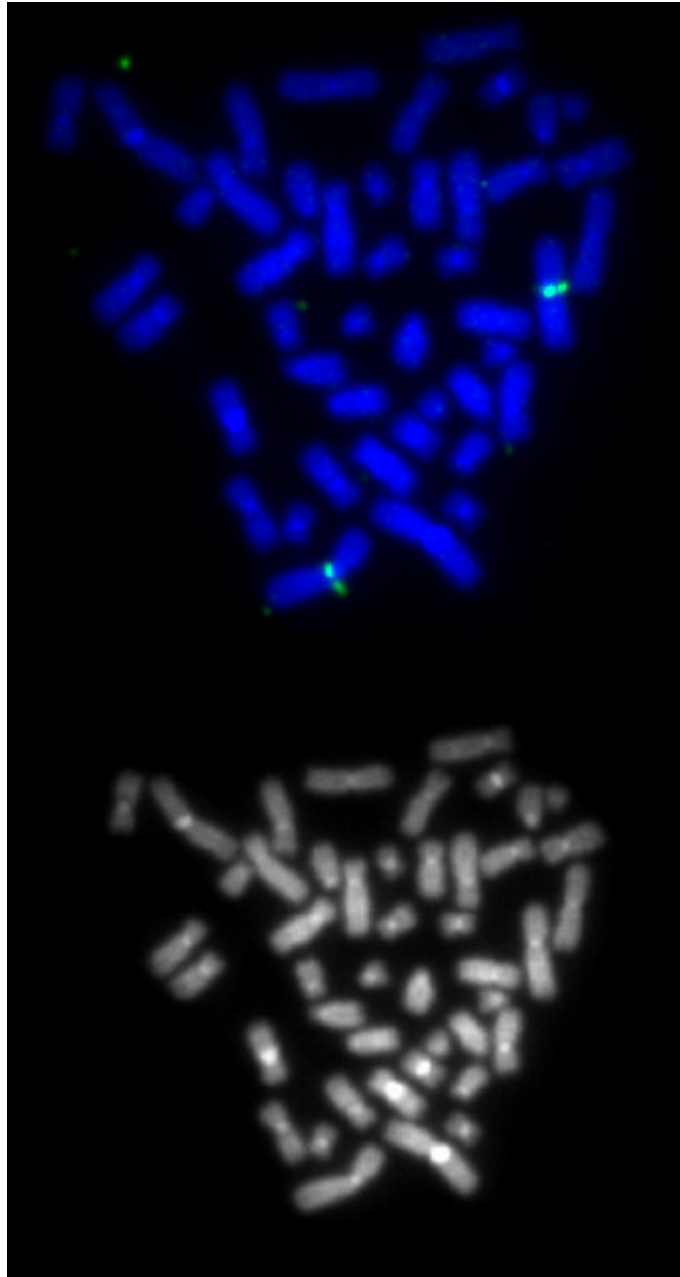


Abbildung 14: Die durch Alu-PCR amplifizierte und mittels Nick-Translation mit Biotin markierte YAC-Sonde wurde bei Verwendung von 300 ng Proben-DNA, 50 µg menschlicher *COT-1* DNA und 50 µg Heringssperma-DNA pro Objektträger CISS hybridisiert. DAPI-Färbung ermöglichte die Lokalisation des FITC-Signals in der spezifischen Chromosomenregion.

- **Idiopathische Oligospermie**
 - **Mutationsanalyse**

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen bei Patienten mit idiopathischer Oligospermie sind in Tabelle 18 zusammengefaßt. Die Mutationanalyse von *CYP21* dieser Stichprobe (n = 8) brachte folgende Ergebnisse:

Bei zwei Patienten haben wir eine Splice-Site-Mutation im Intron 2 (SplI2) gefunden. Bei einem anderen Patienten wurde ein Aminosäureaustausch im Exon 4 (I172N) nachgewiesen.

Die Ergebnisse des Mutationsscreenings für häufige und relevante Mutationen in *CYP21* stimmen mit den hormonanalytischen Befunden überein.

- Hormonanalytische Untersuchungen der Stichprobe idiopathische Oligospermie
- Hinweise auf partielle 21-OH-Defizienzen

Als hormonanalytisch auffällig für eine partielle 21-OH-Defizienz wurden analog zu den Untersuchungen der PCOS-Stichprobe alle Patienten, bei denen die Parameter 21-DOF und 21-DOF/F nach ACTH \geq MW + 2SD gegenüber der Kontrollgruppe zutraf, gewertet (Tabelle 15).

Insgesamt wurden bei drei (38%) Patienten Hinweise auf partielle 21-OH-Defizienz gefunden. Bei diesen Patienten lagen erhöhte Werte für 21-DOF/F vor. Die molekulargenetische Diagnostik dieser Patienten ergab Punktmutationen in *CYP21*.

- Hinweise auf partielle 3 β -HSD-Defizienzen

Die Diagnose einer partiellen 3 β -HSD-Defizienz stützt sich auf die Auswertung der Steroid-Konzentrationsmessungen von DHEAS basal und Kortisol basal im Blutplasma und dem aus diesen Meßgrößen berechneten Parameter DHEAS/F (Q_2).

Nach der Auswertung der Hormonparameter konnten bei vier Männern der Stichprobe im Blutplasma erhöhte Werte für DHEAS oder DHEAS/F gefunden werden. Zwei davon hatten jedoch eine 21-OHD, die zu erhöhten Werten von DHEAS oder DHEAS/F führen kann. Demzufolge konnte nur bei zwei von acht Patienten mit IO eine 3 β -HSD-Defizienz nachgewiesen werden.

In Tabellen 14 und 16 sind die Werte für die Probanden und die Kontrollgruppe zusammengestellt.

Tabelle 16: Basal- und ACTH-stimulierte Werte für 21-DOF, F, 17 α -OHP und errechneten $Q_1 = 100 \times 21\text{-DOF}_A/F_A$, bei Patienten mit idiopathischer Oligospermie und der Kontrollgruppe sowie Ergebnisse des Mutationsscreenings für *CYP21* (A = nach ACTH-Test). **) $>$ MW + 2 SD

Nr.	F nmol/l basal	F nmol/l Test	21-DOF nmol/l basal	21-DOF nmol/l Test	Q_1	17 α - OHP nmol/l basal	17 α - OHP nmol/l Test	Mutation in <i>CYP21</i>
Kontrollgruppe:								
MW	358	809	0,21	0,86	0,107	2,49	6,33	
SD	155	117	0,05	0,16	0,026	0,81	1,05	
MW+2 SD	668	1043	0,36	1,48	0,159	4,11	8,43	
Probanden:								
1	713	920	0,58**	2,00**	0,22**	8,1	9,8**	Sp112
2	466	754	0,64**	1,20	0,16(**)	3,6	9,9	-
3	522	974	0,70	2,70**	0,28**	3,3	6,2	I172N
4	254	996	0,27	1,28	0,13	2,5	6,5	-
5	398	864	0,14	1,1	0,13	4,4	8,4	-
6	236	592	0,09	0,28	0,05	2,8	3,5	-
7	154	512	-	0,47	0,09	2,4	5,7	-
8	420	638	0,44	1,49**	0,23**	4,6	6,9	Sp112

Tabelle 17: Meßwerte für DHEAS, A basal und nach ACTH-Test und ermittelte Quotienten $Q_2 = \text{DHEAS}_b / F_b$, $Q_3 = \text{DHEAS}_b / A_b \times 1000$ bei Patienten mit idiopathischer Oligospermie sowie MW und SD der Kontrollgruppe; **) $> \text{MW} + 2 \text{ SD}$

Nr.	DHEAS $\mu\text{mol/l}$ basal	Q_2	A nmol/l basal	Q_3
Kontrollgruppe:				
MW	5,10	1,61	2,37	2,39
SD	1,84	0,63	0,90	1,05
MW+2 SD	8,78	2,87	4,17	4,49
Probanden:				
1	7,9	1,11	3,9	2,03
2	5,8	1,24	4,5	1,29
3	8,9**	1,89	4,7	1,70
4	6,3	2,50	2,3	2,76
5	5,43	1,36	9,6	0,60
6	12,9**	5,47**	6,5	1,98
7	4,49	2,91**	2,9	1,55
8	10,1**	3,90**	2,6	2,41

• **Vergleiche der molekulargenetischen und hormonanalytischen Befunde**

Für einen besseren Vergleich von Phänotyp mit Genotyp sind die Ergebnisse der hormonanalytischen und molekulargenetischen Untersuchungen bei den Stichproben für PCOS und idiopathische Oligospermie in Tabelle 18 zusammengefaßt.

Wie aus Tabelle 18 ersichtlich, läßt sich eine gute Übereinstimmung zwischen hormonanalytisch nachgewiesenen partiellen 21-OH-Defizienzen und Punktmutationen in *CYP21* feststellen.

Die Patienten Nummern beziehen sich auf die Tabellen 13, 14, 15 bzw. 16.

Tabelle 18: Ergebnisse der hormonanalytischen und molekulargenetischen Untersuchungen der Stichproben von PCOS und idiopathischer Oligospermie (IO), (+): β -HSD-Defizienz unwahrscheinlich, da 21-OH-Defizienz vorhanden.

Patienten-Nr.	Klinische Ausprägung	Mutation in <i>CYP21</i>	21-OH-Defizienz	β -HSD-Defizienz /17,20-Lyase-Hyperaktivität
1	PCOS	–	–	–
2	PCOS	–	–	+
3	PCOS	–	–	–
4	PCOS	–	–	+
5	PCOS	–	–	–
6	PCOS	SpIln2/I172N	+	(+)
7	PCOS	–	–	–
8	PCOS	–	–	+
9	PCOS	–	–	–
10	PCOS	SpIln2	+	–
11	PCOS	SpIln2	+	(+)
12	PCOS	–	–	+
13	PCOS	–	–	+
14	PCOS	–	–	–
15	PCOS	–	–	–
16	PCOS	–	–	+
17	PCOS	–	–	–
18	PCOS	–	–	+
19	PCOS	–	–	+
20	PCOS	SpIln2	+	(+)
21	PCOS	–	–	+
1	IO	SpIln2	+	–
2	IO	–	–	–
3	IO	I172N	+	(+)
4	IO	–	–	–
5	IO	–	–	–
6	IO	–	–	+
7	IO	–	–	+
8	IO	SpIln2	+	(+)

Diskussion

• Überblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung partieller 21-OH und 3 β -HSD-Defizienzen für die Ätiopathogenese von Fertilitätsstörungen bei der Frau und beim Mann zu untersuchen. In die Arbeit flossen die Ergebnisse von drei Stichproben, Patienten mit AGS als positive Kontrolle, Patientinnen mit PCOS und Patienten mit IO, ein. Parallel zu den genannten Stichproben wurden zwei Gruppen hinsichtlich PCOS und IO gesunder Probanden als Kontrollen einbezogen.

Wir haben ein Mutationsscreening für 14 häufige und relevante Mutationen in *CYP21* bei allen Probanden durchgeführt. In der AGS-Stichprobe fanden sich in *CYP21* typische Mutationen in 88,7% der Fälle, die in Tabelle 11 dargestellt sind. Bei PCOS und IO-Stichproben wurden zunächst hormonanalytische Untersuchungen auf partielle 21-OH- und 3 β -HSD-Defizienzen durchgeführt. Wir erhielten bei 4 von 21 PCOS-Patientinnen erhöhte 21-DOF-, 21-DOF/F- bzw. 17 α -OHP-Werte nach ACTH-Test, die auf partielle 21-OH-Defizienzen hinweisen. Diese Fälle zeigten Punktmutationen in *CYP21*. Bei Patienten mit IO wurden ebenfalls Punktmutationen in *CYP21* in drei von acht Fällen nachgewiesen. Bei diesen heterozygoten Männern waren hormonanalytische Hinweise auf partielle 21-OH-Defizienz gefunden worden. Zusätzlich wurden bei neun PCOS-Patientinnen erhöhte basale DHEAS- oder DHEAS/F-Werte gefunden, die als Hinweise auf partielle 3 β -HSD-Defizienzen gedeutet wurden. In der IO-Stichprobe wurden erhöhte basale DHEAS oder DHEAS/F-Werte als Hinweise auf partielle 3 β -HSD-Defizienzen bei zwei Patienten gefunden. Damit wurden bei den Patientinnen mit PCOS in 13 von 21 Fällen eine partielle 21-OH-Defizienz oder eine partielle 3 β -HSD-Defizienz gefunden, während bei den Patienten mit IO in fünf von acht Fällen eine partielle 21-OH-Defizienz oder eine partielle 3 β -HSD-Defizienz nachgewiesen wurde.

• Stellungnahme zur Auswahl hormonanalytischer Methoden

Da die Auswahl der Methoden zur Aufgabenstellung gehörte, wird sie in die Diskussion aufgenommen.

Wir fanden mit Hilfe von 21-DOF/F-Werten nach ACTH-Test bei der PCOS-Stichprobe (19%) und bei den Männern mit idiopathischer Oligospermie (38%) partielle 21-OH-Defizienzen im signifikanten Unterschied zu den Kontrollgruppen (männliche Probanden 4% bzw. weibliche Probanden 6%). Die Probandengruppen unterscheiden sich hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens von partiellen 21-OH-Defizienzen von der europäischen Mischbevölkerung, für die eine Prävalenz partieller 21-OH-Defizienzen von ca. 5-6% errechnet wurde (Speiser et al. 1985).

Den eigenen Erfahrungen und denen der internationalen Literatur entsprechend, wurde eine partielle 21-OH-Defizienz mit 17 α -OHP nach ACTH-Test und darüberhinaus mit 21-DOF nach ACTH-Test im Blutplasma bestimmt. Für den zu erwartenden Meßbereich waren für 17 α -OHP falsch negative Werte bei heterozygoten Anlagenträgern und falsch positive Werte bei homozygoten Wildtypträgern zu 20 bis 50% bekannt (Gueux et al. 1988, Dolzan et al. 1999). Milewicz und Medras (1987), Fiet et al. (1988), Forest et al. (1994) und Brunelli et al. (1994) bestimmten deshalb 21-DOF als diagnostischen Parameter für 21-OH-Defizienzen. Die erwähnte Überlappung von Heterozygoten und Homozygoten tritt bei der Verwendung von 21-DOF nicht auf. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde deshalb der Schwerpunkt auf die 21-DOF-Bestimmung gelegt. Zur weiteren Differenzierung zwischen partiellen 21-OH-Defizienzen (heterozygot) und Normalwerten (homozygot normal) wurde Kortisol nach ACTH-Test gemessen, das aus 21-DOF durch Hydroxylierung entsteht und der Quotient aus 21-DOF- und Kortisolwerten berechnet. Als Hinweis auf eine partielle 21-OH-Defizienz wurde ein Quotient gewertet, der über Mittelwert + 2SD der Kontrollen lag. 21-DOF wird bei 21-OH-Defizienz in relativ großen Mengen aus 17 α -OHP gebildet. Dieser alternative Stoffwechselweg (Abbildung 15) spielt im gesunden Organismus eine untergeordnete Rolle (Fiet et al. 1988) und ist bei 11-OH-Defizienzen sogar blockiert. Ein Mangel an 21-OH provoziert zwangsläufig die Aktivierung dieses Nebenweges, woraus sich die Spezifität von 21-DOF für diese Enzymdefizienz erklärt.

Unsere hormonanalytischen Ergebnisse bei der Stichprobe idiopathische Oligospermie wurden durch eine gute Übereinstimmung mit der molekulargenetischen

Untersuchungsergebnissen bestätigt. Es wurde eine eindeutige Phänotyp-Genotyp-Korrelation festgestellt. Bei der PCOS-Stichprobe war in einem Fall nur erhöhte 17α -OHP-Werte (Patientin Nr. 6, Tab. 12) gefunden. Diese Patientin zeigte eine Punktmutation in *CYP21*. Eine Wiederholungsmessung des 21-DOF war in diesem Fall aufgrund fehlenden Untersuchungsmaterials leider nicht möglich.

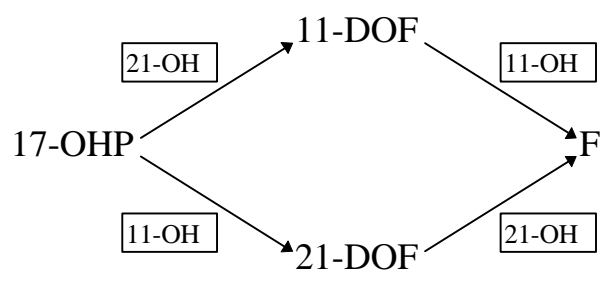


Abbildung 15: Zwei alternative Stoffwechselwege von 17α -OHP zu F (nach Milewicz et al. 1984)

21-DOF sollte außerdem als Marker favorisiert werden, weil es überwiegend in der NNR synthetisiert wird, 17α -OHP dagegen auch reichlich in den Gonaden (Weil et al. 1979, Wichmann, 1981) und in der Plazenta (Milewicz et al. 1984). Daraus ergibt sich eine weitgehende Stabilität und Unbeeinflussbarkeit von 21-DOF durch Alter und Menstruationszyklus der Frau (Fiet et al. 1988). Trotzdem wurde für die Diagnostik von klassischem und nichtklassischem AGS von vielen Untersuchern immer wieder 17α -OHP als Marker benutzt.

So findet man bei heterozygoten Anlagenträgern oft keine Erhöhung des 17α -OHP vor und nach ACTH-Stimulation, dagegen aber im Vergleich zu Gesunden erhöhte 21-DOF-Werte (Gourmelen et al. 1984, Heinrich et al. 1984, Milewicz und Medras 1987).

Brunelli et al. (1994) fanden bei 39 von 49 Personen aus AGS-Familien ACTH-stimulierte 21-DOF-Werte, welche eine partielle 21-OH-Defizienz annehmen lassen, 17α -OHP korrelierte dagegen nur zu 34,6% mit dem Carrierstatus. Cassorla et al. (1980) untersuchten 13 Elternpaare von Kindern mit 21-OH-Defizienz. Dabei fanden sich im Vergleich zu 14 erwachsenen Kontrollen keine Unterschiede in den Hormonkonzentrationen von 17α -OHP, 11-DOF und F sowohl vor als auch nach ACTH-Test. Dagegen waren die Konzentrationen von 21-DOF bei Eltern im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht ($> \text{Mittelwert} + 2\text{SD}$; $p < 0,0025$; 60 min nach ACTH). Fiet et al. (1988) konnten mit Hilfe der 21-DOF-Konzentrationen nach ACTH-Gabe mehr als 90% der obligat heterozygoten Probanden identifizieren.

Dollzan et al. (1999) fanden Mutationen im *CYP21* bei hyperandrogenämischen Frauen. Aus ihren Untersuchungen schlossen sie, daß basale oder ACTH-stimulierte 17α -OHP-Konzentrationen kein guter Indikator des 21-OH-Defizienz Carrierstatus sind. Anhand dieser Ergebnisse läßt sich die Zuverlässigkeit von 21-DOF zur Diagnose heterozygoter Anlagenträger des 21-OH-Defektes erkennen.

Als Marker partieller 3β -HSD-Defizienzen werden in der Literatur erhöhte Blutplasmakonzentrationen für basales DHEAS beschrieben. Zur Bewertung nutzten wir zusätzlich das Verhältnis von basalen DHEAS- zu Kortisol-Werten. Als hormonanalytischer Hinweis auf eine partielle 3β -HSD-Defizienz wurde es gewertet, wenn der Parameter DHEAS oder DHEAS/F höher als der Mittelwert + 2SD der Kontrollen lag.

• **Stellungnahme zur Auswahl molekulargenetischer Methoden**

Bei der molekulargenetischen Diagnostik eines AGS können verschiedene Methoden zur Analyse des *CYP21* angewandt werden. Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden sowie die apparativen Voraussetzungen werden in der Literatur diskutiert (New et al. 1983, Owerbach et al. 1990, Ohlsson et al. 1997, Ohlsson et al. 1999). 16 häufige Mutationen, die eine 21-OH-Defizienz verursachen, sind bekannt (New et al. 1997). Über die Hälfte sind Mikrokonversionen, entstanden durch ungleiches Crossing-over während der Reduktionsteilung in der Meiose. Ursächlich hierfür ist die enge Nachbarschaft von *CYP21* zu dem Pseudogen *CYP21P*. Das bedeutet, daß übliche Verfahren wie Allelspezifische-Oligonukleotid-Hybridisierung (ASO) und Sequenzierung zur Detektion

von Mutationen primär nicht eingesetzt werden können, da die Mutationen in *CYP21* meistens im Pseudogen *CYP21P* vorhanden sind.

Für den Nachweis von großen Deletionen und Konversionen in *CYP21*-Genen ist deshalb vorausgehend die Unterscheidung des *CYP21* vom *CYP21P* notwendig. Hierfür wurden verschiedene Techniken entwickelt.

Mit RFLP kann die Anzahl der *CYP21*-Gene ermittelt und auf große Deletionen bzw. Konversionen geschlossen werden. Beide Gene können dann getrennt durch eine zusätzliche Schnittstelle im nichtkodierenden Bereich vor dem Exon 1 dargestellt und untersucht werden. Mit der am häufigsten benutzter Endonuklease *TaqI* entsteht für das *CYP21P* ein um 0,5 kb kürzeres Fragment (3,2 kb) im Vergleich zu *CYP21* (3,7 kb) (White et al. 1985).

Bei großen Deletionen fehlen bestimmte Restriktionsfragmente, entweder teilweise oder bei Homozygotie vollständig. Bei Heterozygoten zeigen entsprechende Fragmente eine verringerte Intensität.

Eine häufige Deletion bei AGS umfaßt 30kb im *CYP21/C4*-Gencluster. Diese Deletion betrifft das gesamte *CYP21*, sowie ein benachbartes *C4B*, während das *CYP21P* sowie das *C4A* erhalten bleiben. Bei Patienten, die für diese Deletion homozygot sind, fehlen die diagnostisch bedeutenden Restriktionsfragmente der Gene *CYP21* und *C4B*. Heterozygote zeigen ein Verhältnis von 2 : 1 von *CYP21* : *CYP21P* und *C4A* : *C4B* (Collier et al. 1989).

Mikrokonversionen lassen sich mit *CYP21*-spezifischen Primern und Amplifikation überlappender Fragmente erkennen. Anschließend werden durch Dot-Blot-Hybridisierung mit mutationsspezifischen Oligonukleotiden oder durch Sequenzierung der PCR-Produkte die Mutationen charakterisiert (Owerbach et al. 1990, Mornet et al. 1990 und Wedell & Luthman, 1993).

Es ist auch möglich, mit einem spezifischen Primerpaar, von dem ein Primer außerhalb der 5' aufwärts vom Exon 1 lokalisierten *TaqI*-Spaltungstelle liegt, die homologe Sequenzen beider *CYP21*-Gene durch PCR zu amplifizieren. Mit sich daran anschließender mutationsspezifischer Oligonukleotidhybridisierung oder durch Sequenzierung lassen sich Mikrokonversionen und Punktmutationen in *CYP21* darstellen (Wedell et al. 1994).

Helmberg et al. (1992) geben eine weitere Methode an. Sie amplifizierten *CYP21P* und *CYP21* unspezifisch und klonierten die Amplifikate in einem Plasmidvektor. Durch Kloniehybridisierung mit spezifischen Oligonukleotiden werden die Mutationen detektiert.

Auf der Grundlage dieser Erfahrungen aus der Literatur wählten wir die Kombination der im Abschnitt 2.1. aufgeführten Methoden, mit denen wir im Rahmen unserer Untersuchungen bei AGS zunächst die durch einen 8 bp-Unterschied im Exon 3 gegebene Möglichkeit zur Detektion von Deletion im Exon 3-Bereich von *CYP21* nutzen. In dieser schnell durchführbaren Technik lassen sich die Bereiche des Exon 3 beider Gene durch PCR amplifizieren und die Amplifikate mittels Polyamidgelelektrophorese aufgrund der 8 bp-Längendifferenz getrennt darstellen (Rumbsy et al. 1994). Fehlende Banden verweisen auf eine homozygote oder compound-heterozygote Form der möglichen Mutationen. Wie bei der Darstellung des gesamten Genbereichs im Southern-Blot zeigt eine vom Wildtyp abweichende Bandenstärke eine heterozygote Mutation oder eine Genduplikation an. Jede der möglichen Deletionen verursacht homozygot oder compound heterozygot ein AGS.

Nach dem Ausschluß möglicher Deletionen bzw. Konversionen mittels Southern-Blot-Analyse wurde auf Punktmutationen untersucht. Es gelang, unter Einsatz von spezifischen Primern *CYP21* in drei Abschnitten zu amplifizieren. Die anschließende Sequenzanalyse ermöglichte die vollständige Verifikation von Punktmutationen.

Auf diese Weise konnten bei hoher Sicherheit der Aussage mit einem vergleichsweise geringen Zeitaufwand die häufige das *CYP21*-Gen-betreffenden Mutationen bei 88,7% der AGS Patienten gefunden werden. Für die Pathogenese der molekulargenetisch nicht erfaßten 11,3% der AGS-Fälle (hinsichtlich der *CYP21*-Mutationen) können andere nicht untersuchte Faktoren, aber auch methodische Lücken (z. B. nicht erfaßte Neumutationen in *CYP21*) ursächlich sein.

Die guten Ergebnisse unserer Methodenkombination wurden dann als Grundlage für Untersuchungen der PCOS-Stichprobe und der Stichprobe idiopathische Oligospermie verwendet.

- **Mutationen im Bereich *CYP21***

- Rekombinationen

Als Rekombination wird ein Vorgang bezeichnet, der zu einer neuen Kombination von Genen führt. Dabei kommt es zu einem Crossing over zwischen Chromatiden homologer Chromosomen, wobei der Austausch reziprok ist (Bridges & Morgan, 1923).

- Genkonversionen

Der Begriff Genkonversion wurde von Winkler (1930) und Lindgren (1958) für eine Interaktion von Gensequenzen vorgeschlagen, die nicht reziprok ist, also zu einem ungleichen Austausch von genetischem Material führt. Ein Allel bedingt die Modifikation des zweiten Alleles, speziell des Wildtypalleles (Vogel & Motulski 1986, Baltimore, 1981). Nach Kobayashi (1992) erfolgt bei Genkonversionen in Säugetierzellen eine Heteroduplexformation zwischen beiden Allelen und eine Reparatur der Basenfehlpaarungen. Seiner Meinung nach spielt die Genkonversion repetitiver Gene in der Evolution eine große Rolle. Genkonversionen zwischen Genen und ihren gekoppelten homologen Pseudogenen wird als Mechanismus der Mutationsentstehung angesehen. Higashi et al. (1988) bekräftigen die Bedeutung der Genkonversion, insbesondere für die Häufigkeit der 21-OH-Defizienz.

Das *CYP21* ist das wichtigste Beispiel für intrachromosomale Genkonversion, wobei Sequenzen des Pseudogens, über *CYP21P* in *CYP21* gelangen und umgekehrt. Die Mehrzahl der Punktmutationen in *CYP21* entstehen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Genkonversionen.

Amor et al. (1988) beschreiben mehrere Missense-Mutationen des Codons 172, und Collier et al. (1993) fanden eine Missense-Mutation des Codons 173, die durch eine Genkonversion in einer maximalen Länge von 390 Basenpaaren zwischen *CYP21P* und *CYP21* verursacht worden sein könnten. Eine komplette Genkonversion des *CYP21* durch das *CYP21P* diskutieren Harada et al. (1987) bei zwei Patienten mit 21-OH-Defizienz. Weitere Beispiele für mögliche Genkonversionen des *CYP21* fanden Urabe et al. (1990), Morel et al. (1989) und Speiser et al. (1988).

Weitere Beispiele für Loci mit Mutationen durch Genkonversionen sind der Ersatz von *C4B* durch das vermutliche homologe Pseudogen *C4A* und eine Splice-Mutation des Glucocerebrosidase-Gens (Braun et al. 1990, He & Grabowski, 1992, Sorge et al. 1990, Zimran et al. 1990).

Genkonversion findet auch zwischen Allelischen bzw. verschiedenen Haplotypen statt (oft Gencluster oder große Genfamilien). Man diskutiert dieselben Mechanismen, die bei der Genkonversion zwischen Genen und den assoziierten Pseudogenen angenommen werden (Helmberg et al. 1995).

- Hybridgene

Bei der Fusion von *CYP21P* mit *CYP21* entstehen Hybridgene zum Teil mit großen Deletionen. Die weniger aktive Promotorregion von *CYP21P* kann dabei den Promotor von *CYP21* ersetzen und dessen Expression vermindern (Schulze et al. 1997).

- Punktmutationen

Bisher wurden in der Literatur 16 häufige Punktmutationen in *CYP21* beschrieben, die zu einer 21-OH-Defizienz und zu Störungen auf klinischer Ebene führen. Die Mehrzahl der Punktmutationen, u.a. 8 Missense-Mutationen lassen sich auf eine Genkonversion zwischen *CYP21* und *CYP21P* zurückführen. In Tabelle 19 sind die bekannten Punktmutationen in *CYP21* zusammengefaßt.

Tabelle 19: Punktmutationen in *CYP21*, die mit einer 21-OH-Defizienz einhergehen
(Quelle: Strachan, 1994).

Mutationstyp	Lokalisation	Auswirkung	Auftritt in <i>CYP21P</i>
Splice site Mutation	Intron 2, 3' Ende	Defektives Splicing im ersten Transcript und Aktivierung von cryptic Splice Aceptor von 19 bp vom Ende des Intron 2	+
Splice site Mutation	Intron 7	Translationsstop im Exon 8	-
Frame-shifting Deletion/Insertion	Exon 3, 8 bp Deletion (GAGACTAC) überspannt Codon 110-112	Translationsstop in Exon 3	+
Frame-shifting Deletion/Insertion	Exon 7	Translationsstop im Exon 7	+
Nonsense Mutation	Exon 8, Codon 318, CAG → TAG	Translationsstop im Exon 8	+
Nonsense Mutation	Exon 9, Codon 405, TGG → TAG	Translationsstop im Exon 9	-
Missense Mutation	Exon 1, Codon 30, CCG → CTG	Pro 30 → Leu	+
Missense Mutation	Exon 4, Codon 172, ATC → AAC	Ileu 172 → Asn	+
Missense Mutation	Exon 6, Codon 236, ATC → AAC Codon 237, GTG → GAG Codon 239, ATG → AAG	Ileu 236 → Asn Val 237 → Glu Met 239 → Lys	+
Missense Mutation	Exon 7, Codon 281 GTG → TTG	Val 281 → Leu	+
Missense Mutation	Exon 7, Codon 291 GGT → AGT	Gly 291 → Ser	-
Missense Mutation	Exon 8, Codon 356 CGG → TGG	Arg 356 → Trp	+
Missense Mutation	Exon 10, Codon 453 CCC → TCC	Pro453 → Ser	+
Missense Mutation	Exon 10, Codon 483 CGG → CCG	Arg 483 → Pro	In wenigen Allelen

- Die Charakterisierung der gefundenen Mutationen in *CYP21* in ihrer Häufigkeit

- große Deletionen bzw. Konversionen

In einigen Studien wurden bei AGS-Patienten mit einer 21-OH-Defizienz Allele mit einer Häufigkeit von 10 - 20% nachgewiesen, welche ausgedehnte Genkonversionen und Deletionen aufwiesen (Higashi et al. 1991, Mornet et al. 1991, Wedell et al. 1994, Carrare et al. 1995).

In unseren Untersuchungen traten die beide Mutationstypen bei 24% der Patienten auf. Die meisten der Patienten der oben erwähnten Studien mit diesen Mutationstypen hatten ein klassisches AGS mit SVS. Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Daten überein, da 80% der Patienten mit großen Deletionen bzw. Konversionen in unserer AGS-Studie ein klassisches AGS mit SVS aufweisen.

- SpIn2

Die häufigste Punktmutation in *CYP21* ist die SpIn2-Mutation mit einer Häufigkeit von etwa 30% (Higashi et al. 1991, Mornet et al. 1991, Wedell et al. 1994, Carrare et al. 1995, Jaaskelainen et al. 1997, Bachega et al. 1998). Die SpIn2-Mutation ist die zweithäufigste Mutation, die wir bei der AGS-Stichprobe gefunden haben. In unserer AGS-Studie wurde diese Mutation mit einer Häufigkeit von 24% nachgewiesen.

Erstmals von Higashi et al. (1988) beschrieben ist sie durch eine Sequenzveränderung in Intron 2 von AA/AC-AG gekennzeichnet. Sie führt zu einem defekten Splicing in Intron 2 und zu einer Verschiebung des Translation-Leseraster und dadurch zu einem Kettenabbruch. Es verbleibt eine Restaktivität des Genproduktes 21-OH von 0 - 5%.

Alle Patienten, die diese Mutation homozygot tragen, hatten ein klassisches AGS mit SVS und fast alle Patienten, welche für diese Mutation heterozygot sind und eine weitere Mutation mit ähnlich schwerer Auswirkung tragen, hatten im Unterschied zu den Ergebnissen von Wilson et al. (1993, 1995) ein AGS der SV-Form.

- I172N

Die zweithäufigste Punktmutation, die wir bei der AGS-Studie mit einer Häufigkeit von 20,9% gefunden haben, ist eine I172N-Mutation. Allele mit der Mutation treten homozygot bei 2 - 20% der Patienten mit einem klassischen-AGS auf, wobei die Allelfrequenz in unterschiedlichen Populationen erheblich variiert. In Spanien und Italien liegt sie am niedrigsten (Carrera et al. 1995, Ezquita et al. 1995), in Schweden (Wedell et al. 1994) und Finnland (Levo und Partanen, 1997) dagegen hoch.

Über I172N wurde erstmals von Amor et al. 1988 berichtet. Diese Mutation bewirkt den Austausch der hydrophoben Aminosäure Isoleucin zu der polaren Aminosäure Asparagin und wird bei Patienten mit 21-OH-Defizienz mit erhaltener Fähigkeit zur Aldosteronsynthese gefunden. Die Aminosäure ist in dem Abschnitt des Proteins lokalisiert, der normalerweise mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums in Wechselwirkung steht. Isoleucin ist in vielen verschiedenen P450-Enzymen zu finden. Der Austausch vermindert die Bindungsfähigkeit des Enzymes an das endoplasmatische Retikulum. Mit einer Restaktivität des Enzyms von 2% verursacht die Mutation homozygot eine SV-Form des AGS (White et al. 1988, 1994).

Das wurde durch unsere Ergebnisse bestätigt, da die meisten Patienten mit dieser Mutation eine SV-Form aufweisen.

Wir fanden die I172N-Mutation homozygot bzw. compound heterozygot mit Deletion, SpIn2 und V281L-Mutation bei 13 Patienten.

- V281L

Bei 4 Patienten haben wir eine V281L-Mutation gefunden. Alle Patienten tragen diese Mutation compound heterozygot mit einer B-Deletion oder I172N-Mutation. Diese Mutation führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und reduziert die Enzymaktivität je nach Substrat auf 50 % (17 α -Hydroxyprogesteron) bzw. 20% (Progesteron). Unsere Patienten wiesen ein klassisches AGS mit SVS, SV oder LO auf.

- Q318X

Bei 4 Patienten trat eine Q318X-Mutation auf. 6 Patienten tragen diese Mutation compound heterozygot mit einer B-Deletion und einer I172N Mutation. Alle Patienten, die diese Mutation compound heterozygot tragen, wiesen ein klassisches AGS mit SVS oder SV auf. Bei einem Patienten mit SV trat diese Mutation homozygot auf.

Das für Glutamin kodierende Basentriplett CAG wird in den nonsense Codon TAG verwandelt. Die Mutation wird als Ursache für klassische AGS mit SVS und SV beschrieben (Globerman et al. 1988), was durch unsere Ergebnisse bestätigt wird.

- R365W

Bei 2 Patienten haben wir eine R365W-Mutation gefunden. Sie waren homozygot für diese Mutation. Die R365W-Mutation trat bei Patienten mit dem klassischen AGS mit SVS auf. Es handelt sich um eine missense Mutation mit einem Basenaustausch von CGG zu TGG und wurde bei Patienten mit einem klassischen AGS mit SVS oder SV beschrieben (Chiao et al. 1990).

Betroffen ist eine für das steroid metabolisierende Cytochrom P450 beschriebener Domäne (White, 1986). Die relativ seltene Mutation führt zu einer kompletten 21-OH-Defizienz. Die beiden Patienten hatten ein AGS mit SVS.

- P30L

Bei 3 Patienten bestand eine compound heterozygote P30L-Mutation, die Patienten tragen als 2. Mutation eine Deletion. Prolin ist in vielen mikrosomalen P450-Enzymen enthalten und kann für die Orientierung des Enzyms hinsichtlich des aminoterminalen Endes des transmembranen Abschnitts wichtig sein. Bei der P30L-Missensemutation bleiben 60% der Aktivität der Steroid 21-OH erhalten. P30L ist häufig bei der nicht-klassischen Form (late onset) des AGS anzutreffen.

Nikoshov et al. (1997) untersuchten ein seltenes Allel bei zwei Geschwistern mit late onset-Form des AGS. Dieses Allel enthielt 3 Sequenzänderungen:

Eine C/T Transition von 4 Basen vom 5' Translation-Start, eine P30L Substitution und P453S-Substitution. Die letztgenannte Mutation wurde auch in anderen ethnischen Gruppen gefunden, wogegen die P105L-Mutation nur in dieser Familie aufzutreten schien. Sie haben die Funktion der 3 Mutationen getestet mit in vitro Translation nach Expression der mutierten Enzyme in der Zellkultur, während die – 4 Substitution keinen meßbaren Effekt hatte, zeigten die P105L- und L453S-Mutationen eine reduzierte Enzymaktivität von 62% und 68% für 17 α -OHP und 64% für Progesteron. Im Falle einer Kombination hatten diese 2 Mutationen eine Reduktion der Enzymaktivität von 10% für 17 α -OHP und 7% für Progesteron zufolge.

Diese Ergebnisse zusammen mit unseren Ergebnissen deuten darauf hin, daß P105L- und P453S-Allele nur für eine milde Ausprägung der Krankheit verantwortlich sind, solange sie nicht mit einer anderen Mutation kombiniert auftreten. Sie können aber bei der Genotypisierung der Patienten mit dieser Form der 21-OH-Defizienz bedacht werden.

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse unserer AGS-Studie und die eindeutige Korrelation zwischen Genotypen und Phänotypen lassen schlußfolgern, daß die Auswahlkombination der molekulargenetischen Methodik vielversprechend sind.

Die Untersuchung der *CYP21*-Gene mittels spezifischer PCR und ASO ist ein leistungsfähiges, praktikables und hinreichend schnelles Verfahren zum Mutationsscreening bei 21-OH-Defizienz.

• Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei AGS

Die Frage nach einer Phänotyp-Genotyp-Korrelation ist über das wissenschaftliche Interesse hinaus von großer Bedeutung für die Praxis. Sowohl für die Anamnese und Therapiekonzeption als auch für die klinische Prognostik im Zusammenhang mit pränataler Diagnostik ist die Kenntnis des aufgrund molekulargenetischer Befunde zu erwartenden klinischen Typs von Wichtigkeit.

Die Reduktion der Genexpression durch unterschiedliche Mutationen ist aus in vitro Studien bekannt (Higashi et al. 1988, 1991, Tusie-Luna et al. 1991, Wu und Chung,

1991). Bei den meisten Gendeletionen und großen Konversionen sowie bei Punktmutationen, welche einen vorzeitigen Translationsabbruch verursachen, ist kein Genprodukt zu erwarten.

Der Zusammenhang mit den hormonellen und klinischen Befunden ergibt durch die unterschiedlichen Arten der Mutationen sowie durch Homozygotie und compound Heterozygotie ein komplexes Bild.

Trotzdem lassen sich aus den in Tabelle 18 dargestellten Ergebnissen Beispiele für eine brauchbare Korrelation erkennen.

Die schwerste Form, das SVS, kam bei allen 5 Patienten mit homozygoter Deletion bzw. Konversion, bei allen 5 Compound Heterozygoten mit Deletionen/Splln2, bei allen 10 Patienten mit Homozygotie Splln2, bei 4 compound heterozygoten mit Deletion bzw. Konversion/I172N, bei 2 Homozygoten mit der Mutation R365W sowie bei 2 von 5 compound heterozygoten Splln 2/I172N und bei allen 4 Patienten mit compound heterozygoter Deletion bzw. Konversion/Q318X, bei 2 Patienten mit Q318X/I172N vor.

Daraus ergibt sich bereits, daß die Deletionen und Konversionen sowie Splln2 und wahrscheinlich auch Q318X, 8bp-Deletion, W406X, R356 und I172N-Mutationen, die schwersten klinischen Erscheinungen hervorrufen. Das läßt sich auch bei den klassischen AGS mit SVS erkennen, zu der die restlichen 2 Fälle mit homozygoter Deletion/Konversion und compound heterozygoten Splln 2/I172N gehören.

Als weniger schwerwiegend lassen sich I172N und V281L einstufen. Die seltenen Mutationen R339H und P453S wurden bei keinem Patienten in unserer AGS-Studie nachgewiesen.

Die Ergebnisse von Genotyp-Phänotyp-Untersuchungen aus der Literatur sind widersprüchlich. Untersuchungen aus den 80iger Jahren fanden Korrelationen zwischen einigen Mutationen, Grad des Enzymmangels und klinischer Ausprägung (Amor et al. 1988, Globerman et al. 1988, Harada et al. 1987, Jospe et al. 1987, Owerbach et al. 1990, Rodrigues et al. 1987, White et al. 1984, Speiser et al. 1988, White et al. 1991).

Später konnten das allerdings andere Arbeitsgruppen, zum Beispiel Wilson et al. (1995) an einer größeren Gruppe von AGS-Patienten (n = 200) mit 26 unterschiedlichen Genotypen, nicht bestätigen.

Bei der Compound Heterozygotie V281L/Deletion traten alle drei verschiedenen Formen des AGS auf. Patienten mit Exon 1 P30L/Splln2-Mutation litten unter SVS oder nicht-klassischer Form des AGS. Dagegen berichteten Jaaskelainen et al. (1997) von einer bevölkerungsweiten Analyse von 120 Patienten mit 21-OH-Mangel in Finnland. Eine CYP21-Genotypisierung erfolgte bei 78 Patienten (65%).

Alle Patienten mit Mutationen, die schwerwiegende Defekte der enzymatischen Aktivitäten bewirken, hatten ein klassisches AGS mit SVS.

Zum Beispiel hatten Patienten, die eine der Splln-Mutation, homozygot oder compound heterozygot mit einer Deletion aufwiesen, eine schwere Mineralkortikoid-Defizienz und wie in unseren Fällen ein klassisches AGS mit SVS.

Andere Mutationen, zum Beispiel I172N wiesen homozygot oder heterozygot mit Deletionen ein weites Spektrum von Phänotypen des AGS auf.

Wedell (1994) berichtet über die Analyse von 400 Allelen (n = 200). Mehr als 90% der Allele erwiesen sich als durch Interaktion mit dem Pseudogen entstanden. Inklusive Gendeletionen wurden 9 kleinere Sequenzaberrationen und 13 seltene meist populationsspezifische Mutationen charakterisiert und den klassischen Formen des AGS zugeordnet. Einige der seltenen Mutationen betrafen auch das Pseudogen, was auf einen Founder-Effekt hinweist.

Wedell unterteilte die häufigsten Mutationen in 3 Klassen: Die Mutationen, die meistens bei milder Form auftreten, die einer mittelschweren Form des AGS zugeordnet sind und solche, die die schwerste Form des klassischen AGS mit SVS aufweisen.

Das ermöglichte es, das klinische Bild bei betroffenen Patienten, basierend auf der Genotypisierung vorherzusagen. Das Risiko einer klassischen Form mit SVS und pränataler Virilisierung konnte abgeschätzt werden und so eine Übertherapie in mild betroffenen Fällen vermieden werden.

Wedell sah keine Ausnahme von der Regel, nach der die Patienten, die homozygot für die Null-Mutation (Homozygotie für B-Deletion) sind, ohne frühzeitige Therapie eine klassische Form des AGS mit SVS und schwerer Virilisierung (wenn weiblich) entwickeln. Das entspricht auch unseren Befunden.

Ein weiteres Beispiel für Genotyp-Phänotyp-Korrelation brachten Bachega et al. (1998). Sie bestimmten mit Allel-spezifischer PCR die Häufigkeit von Punktmutationen in CYP21

in 130 brasilianischen Patienten mit der klassischen SVS-Form bzw. SV-Form und der nicht-klassischen LO-Form. Ein Screening nach 15 Punktmutationen bedeckte 80% der betroffenen Allele. Wie in unserer Studie fanden sie bei den meisten Patienten (42%) eine Splln2 mit der klassischen SVS-Form. Die I172N bei 33% der Patienten lag bei der SV-Form und V281L bei 40% der Patienten mit der nichtklassischen LO-Form vor. Zwischen Homozygotie und Compound Heterozygotie wird in der Studie nicht unterschieden. Die Frequenz der häufigsten Punktmutationen bei der klassischen Form war ähnlich der Frequenz in anderen Ländern.

Nach der 21-OH-Restaktivität wurden drei Gruppen von Punktmutationen unterschieden: Gruppe A (weniger als 2%), Splln2. Gruppe B (um 2%) I172N und Gruppe C (mehr als 18%) V281L.

In der Gruppe A hatten 62% der Fälle ein klassisches AGS mit SVS, in der Gruppe B 96% eine SV und in der Gruppe C hatten 88% der Fälle eine nichtklassische LO-Form. Bei 20% der Fälle wurde keine Mutation gefunden, was die Autoren mit nicht erfaßten seltenen populationsspezifischen Mutationen erklären.

Analog zu unseren 1999 (Kapelari et al.) veröffentlichten Ergebnissen brachten die Untersuchungen von Lako et al. (1999) ein weiteres Beispiel für eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Sie analysierten *CYP21* bei Patienten (n = 142) aus Großbritannien. Die häufigsten detektierten Mutationen waren große Deletionen bzw. Konversionen bei 45% der betroffenen Allele. Mit abnehmender Häufigkeit folgten Splln2 mit 30% der Fälle, R357W mit 9,8% und I172N bei 7% der Fälle. Alle Patienten wiesen ein klassisches AGS mit der SVS- bzw. SV-Form auf, zwischen Homozygotie und Heterozygotie wurde nicht unterschieden.

- Mögliche Erklärungen für die phänotypische Variabilität beim AGS

Trotz der geschilderten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bleiben in unserer Studie wie bei den Untersuchungen der anderen Autoren Unterschiede der klinischen Ausprägung bei Patienten gleichen Genotyps.

Obwohl zum Beispiel die meisten Homozygoten für Deletionen und Konversionen in unseren Untersuchungen ein SVS hatten, wiesen zwei nur eine SV-Form auf.

Bei compound heterozygotie V281L kamen alle Schweregrade vor.

Witschel et al. (1998) sahen bei ihren 83 Patienten mit Homozygotie oder Compound Heterozygotie für Deletion und Splln2 eine phänotypische Variabilität, die von asymptomatisch bis zu klassischem AGS mit SVS- bzw. SV-Form reichte.

Die Erscheinung unterschiedlicher Phänotypen bei identischem Genotyp kommt sowohl bei autosomal dominanter als auch rezessiver Mutationen vor. Für autosomal rezessive Merkmale können folgende Erklärungsmöglichkeiten in unsere Erwägungen einbezogen werden:

1. Unvollständige Erfassung des Phänotyps, d.h. Scheinidentität.
2. Die Wirkung modifizierender Allele anderer Loci, vor allem des gleichen Stoffwechselweges bzw. Kompensation über unterschiedliche Nebenwege.
3. Äußere Einflüsse, z. B. des pränatalen hormonellen mütterlichen Milieus.

Hier können auch andere prä – und postnatale Umweltfaktoren eine Rolle spielen, wie sie unter 4.5. näher beschrieben sind.

4. Bei der 21-OH-Defizienz ist außerdem zu beachten, daß die mit „Deletion/Konversion“, bezeichneten Mutationen unterschiedlich sein können und es sich also nicht um einen vollkommen identischen Genotyp handeln muß.

5. Zu unterschiedlichen klinischen Ausprägung kann es durch genetisches und besonders auch epigenetisches Imprinting kommen.

.

- **Diskussion der PCOS-Befunde**
- Adrenale Enzymdefizienzen bei PCOS

PCOS wird als sehr häufige Ursache weiblicher Infertilität angesehen, wobei u.a. endogen und exogen bedingte Enzymstörungen in der pränatalen Entwicklung als Ausgangspunkt vermutet werden (Dörner, 1995). Erste hormonanalytische Untersuchungen des Institutes für Experimentelle Endokrinologie der Charité weisen auf verminderte Aktivitäten des adrenalen Enzyms 21-OH und des adrenalen/gonadalen Enzyms 3 β -HSD als mögliche prädisponierende Faktoren für das PCOS sowie Formen des Kryptorchismus und idiopathischen Oligospermien hin (Dörner, 1992).

Die Ergebnisse unserer hormonanalytischen Untersuchungen von 21 PCOS-Patientinnen zeigten bei vier Patientinnen partielle 21-OH-Defizienzen, welche sich durch erhöhte 21-DOF und/oder 17 α -OHP-Spiegel nach ACTH-Stimulation darstellen ließen. Der basale Plasma-DHEAS-Spiegel und/oder die Ratio von DHEAS/F war bei 12 Frauen deutlich erhöht, was auf partielle 3 β -HSD-Defizienzen und/oder 17,20-Lyase-Hyperaktivitäten hinweist. Hinweise auf 17,20-Lyase-Hyperaktivitäten wurden bei allen PCOS-Patientinnen, bei denen partielle 21-OH-Defizienzen hormon- als auch genanalytisch nachweisbar waren, gefunden. Erhöhte Δ 5-Steroide (u.a. erhöhtes DHEAS im Blutplasma) werden bei Trägern von homozygoten oder compound-heterozygoten Mutationen gefunden, die zu klassischen und nichtklassischen Formen der 3 β -HSD-Defizienz führen (Simard et al. 1993, Mendonza et al. 1994, Simard et al. 1994, Russel et al. 1994). Zerah et al. (1994) fanden jedoch bei 6 Patienten mit nichtklassischer Form der 3 β -HSD-Defizienz weder in den bisher als für Mutationen relevant geltenden Exonbereichen des 3 β -HSD-*TypII*-Genen noch in den Genen der 3 β -HSD-*TypI* Mutationen. Die Autoren diskutieren nichtgenetische Mechanismen, die für eine Hemmung der enzymatischen Aktivität der 3 β -HSD verantwortlich wären.

Pollard & Dyer (1985) konnten bei Ratten durch Streß während der Schwangerschaft bei den männlichen Nachkommen eine lebenslang persistierende Hemmung der testikulären 3 β -HSD-Aktivität mit der Konsequenz erniedrigter Testosteronwerte sowohl im fetalen Stadium als auch bei adulten Tieren erzeugen. Erniedrigte frühpostnatale Testosteronwerte bei männlichen Nachkommen gestreßter Rattenmütter wurden ebenfalls von Stahl et al. (1978) beobachtet. Barnes et al. (1994) postulieren, daß bei Untersuchungen hinsichtlich einer verminderten 3 β -HSD-Aktivität häufig falsch positive Resultate durch erhöhte Aktivitäten der 17-Hydroxylase/17,20-Lyase erhalten wurden.

Als Ursache für den genetisch nicht erklärbaren vierfachen Anstieg der Prävalenz des PCOS bei nach 1955 in Ostdeutschland geborenen Frauen wird der DDT-Metabolit o,p'-DDD diskutiert (Dörner et al. 2000). O,p'-DDD hat sich als starker Inhibitor der 3 β -HSD erwiesen. DDT besitzt eine Östrogenaktivität und produziert bei Ratten eine dem PCOS ähnliche Symptomatik (Götz et al. 1998). DDT selbst und weitere seiner Metaboliten wirken möglicherweise als Aktivatoren der 17,20-Lyase. Nach 1955 war die Bevölkerung Ostdeutschlands einer massiven DDT-Anwendung ausgesetzt. Die Wirkungen des DDT und seiner Metaboliten könnten den hohen Anteil von Hinweisen auf partielle 3 β -HSD-Defizienzen, die im nach 1955 in Ostdeutschland geborenen PCOS-Klientel festgestellt wurde, als auch die nicht durch partielle 21-OH-Defizienz gekennzeichneten Fälle sowie den hohen Anteil von Patienten mit Hinweisen auf partielle 3 β -HSD-Defizienz unserer PCOS-Stichprobe zumindest partiell erklären (Dörner et al. 2000).

Eine molekulargenetische Analyse der 3 β -HSD-Gene war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Vorläufig müssen deshalb Hinweise auf partielle 3 β -HSD-Defizienzen nur als hormonelle Auffälligkeiten gewertet werden, über deren Genese in der Literatur genetische und epigenetische Mechanismen diskutiert werden.

Frauen mit AGS, welches durch eine 21-OH-Defizienz verursacht wird, können ein PCOS-ähnliches Syndrom zeigen (Yen SSC et al. 1980, Barnes et al. 1994). Viele Autoren betonen die Ähnlichkeit zwischen Alterationen dieser Form von AGS und PCOS (Bricaire et al. 1979, Crousos et al. 1982, Lee et al. 1982, Sahin & Kelestimur, 1997).

Dieses unterstützt unsere Hypothese, daß an der Entstehung eines PCOS adrenale Enzymdefizienzen der Steroidbiosynthese in einer Vielzahl der Fälle beteiligt sind. Aus diesem Grund ist bei der Diagnose des PCOS immer ein AGS auszuschließen, und da androgenabhängige Ovarfunktionsstörungen sehr häufig sind, sollte bei jeder

Ovarfunktionsstörung ein PCOS als Ursache in Erwägung gezogen werden.

- **Interpretation der Molekulargenetik**

Bei den vier Patientinnen mit partieller 21-OH-Defizienz (19%) wurden fünf heterozygote Punktmutationen (23%) gefunden. Es handelte sich um drei Splice-Mutationen SpIn 2, bei einer Frau um eine I172N-Mutation und bei einer weiteren Frau um die missense-Mutation I172N und eine SpIn 2 Mutation auf dem gleichen Allel. Die Frequenz der *CYP21*-Heterozygoten ist mit 19% nach der vorliegenden Erhebung höher als in der Normalpopulation (5-8%, Speiser et al. 1985). Diese Allele bewirken, wie im Abschnitt AGS (4.5.) dargestellt, homozygot oder compound heterozygot die schweren Form des AGS. Das PCOS kann in diesen Fällen als heterozygote Manifestation bestimmter *CYP21*-Allele angesehen werden. Auf diese Weise erklärt sich die häufige Familiarität des PCOS in einem autosomal dominanten Erbgang. Heterozygote Mutationen in *CYP21* wurden bei PCOS bisher nicht gefunden.

Aus den Untersuchungsergebnissen resultiert, daß *CYP21*-Mutationen zur Entstehung eines PCOS führen können, der größere Teil jedoch auf hormonellen Verschiebungen beruht, deren Grundlage noch unbekannt ist. Infrage kommen vor allem Umweltfaktoren. Insgesamt ergibt sich eine kausale Heterogenität des PCOS, die teilweise dem monogenen Modell folgt. Die dabei von Azziz et al. (1998) postulierte „Variable Expressivität“ erklärt sich in unseren Untersuchungen durch die Allelische Variabilität (Multiple Allelie), wie sie bereits im Kapitel AGS (4.5.) dargestellt wurde. Belege für ein multifaktorielles Modell des PCOS in Fällen, bei denen keine Mutation festgestellt werden konnte, haben sich erst in letzter Zeit u.a. aus den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Dörner über DDT-Wirkungen ergeben.

Weiterhin wurden im Zusammenhang mit dem PCOS Assoziationen zwischen Produkten des Steroidsynthese-Gens *CYP11A*, des Insulin-Gens und ein durch Insulin Resistenz bedingten erhöhtem Insulin-Spiegel beobachtet (Sobaba et al. 1994, Talbot et al. 1996, Watson et al. 1997, Gharani et al. 1997). Gharani et al. (1997) und Franks et al. (1997) fanden jedoch keine Mutationen in den Genen von *CYP11A*, *CYP17*, Glukogensynthetasegen oder IGF-II.

Um mögliche Auswirkung von Leptin auf die Pathogenese des PCOS abzuschätzen, haben Mantzoros et al. (1997) den Leptin-Spiegel im Serum adipöser Frauen mit PCOS gemessen. Sie fanden allerdings keine Korrelation zwischen zirkulierenden Insulin- und Leptinspiegeln im Vergleich zu Kontrollpersonen gleichen Alters und Gewichtes.

Weitere gezielte Untersuchungen monogen bedingter familiärer Formen des PCOS als auch das PCOS verursachender Umweltfaktoren sind vielversprechend.

Im Rahmen unserer Studie wurden eine Übereinstimmung sowohl zwischen den gut charakterisierten Mutationen im *CYP21* und der Manifestation des PCOS bei einem Teil der Fälle als auch eindeutige Hinweise auf Zusammenhänge zwischen das PCOS verursachende adrenale Enzym anomalies und Umweltfaktoren erbracht (Ghanaati et al. 1999, Ghanaati et al. 2000, Dörner et al. 2000).

- **Diskussion der Befunde bei idiopathischer Oligospermie**

Die Untersuchung der 8 Patienten mit idiopathischer Oligospermie ergab bei drei Männern partielle 21-OH-Defizienzen, die sich als erhöhte 21-DOF-Konzentrationen im Blutplasma und 21-DOF/F nach ACTH-Stimulationstest darstellen ließen. Bei vier der Patienten war der basale Plasma-DHEAS-Spiegel oder die Ratio von DHEAS/F deutlich erhöht, was auf eine partielle 3 β -HSD-Defizienz oder 17,20-Lyase-Hyperaktivität hinweist. Da bei zwei dieser Patienten genetisch und endokrinologisch eine partielle 21-OH-Defizienz nachgewiesen wurde, kann bei ihnen eine partielle 3 β -HSD-Defizienz weitgehend ausgeschlossen werden. Die molekulargenetischen Befunde zeigten bei den Männern mit partieller 21-OH-Defizienz heterozygote Punktmutationen in *CYP21*, zwei Splice-Site-Mutationen SpIn2 und eine I172N. Hervorzuheben ist, daß die molekulargenetischen Untersuchungen bei Männern mit idiopathischer Oligospermie zum ersten Mal durchgeführt wurden. Sie ergänzen die Arbeiten der Forschungsgruppe um Dörner, die bei Patienten mit idiopathischer Oligospermie und bei Mann-zu-Frau-Transsexuellen eine Häufung partieller 21-OH-Defizienzen und Hinweise auf partielle 3 β -

HSD-Defizienzen fand (Ritsch 1995, Lindner 1995). Aiman und Boyar (1982) hatten bei 7 von 13 unbehandelten Mann-zu-Frau-Transsexuellen Spermiogenesestörungen beobachtet. Wie bei unseren idiopathischen Oligospermie -Fällen waren die aktuellen Sexualhormonbefunde normal.

Um mögliche Pathomechanismen der idiopathischen Fertilitätsstörungen zu erklären, muß man zwischen den speziellen Hormonsituationen in der Fetalperiode und in späteren Lebensperioden unterscheiden. Der Beginn der fetalen NNR-Aktivität in der 8. Schwangerschaftswoche fällt zeitlich mit der anfänglichen Testosteronproduktion der Testes zusammen (Hinrichsen, 1990). Beide hormonproduzierenden Organe zeigen in dieser Phase ausgeprägte Sekretionsleistungen, welche im Hoden ihr Maximum in der 12.-14. Schwangerschaftswoche erreichen (Tapaneinen et al. 1981). Die ausgeprägte HCG-, CRH- und ACTH-Sekretion der Plazenta findet in einer Überstimulation mit folgender Hyperplasie der fetalen Leydigzellen und der fetalen NNR ihren Ausdruck (Hinrichsen, 1990). Der Fetus benötigt die hohen Konzentrationen an Hormonen für die Reifung seiner NNR und die weitere Geschlechtsdifferenzierung (männliche Geschlechtsorgane, Einleitung der Spermiogenese bis zur Meiose, sekundäre Geschlechtsmerkmale, geschlechtsspezifische Gehirndifferenzierung).

Die verschiedenen Hormone gehören neben vielen anderen Faktoren zur unmittelbaren Umwelt des Feten, welche unabhängig von der genetischen Determination dessen Entwicklung beeinflussen kann. Dörner (1980) führte zahlreiche vergleichende Untersuchungen der geschlechtsspezifischen Gehirnentwicklung durch, um die Differenzierung des Hypothalamus-HVL-Gonaden-Systems beschreiben zu können. Die gewonnenen Ergebnisse ermöglichten die Aufstellung zweier ontogenetischer Organisationsregeln:

Transformationsregel: Während der Differenzierung des fetalen Gehirns vollzieht sich die Entwicklung des Steuersystems Plazenta/HVL-Gonade-Hypothalamus zum Regulationssystem Hypothalamus-HVL-Gonade.

Determinationsregel: Die Quantität der primären Stell- und sekundären Regelgröße (z.B. Sexualhormon) kodeterminiert die Qualität des zentralnervösen Reglers und damit den Toleranz- und Funktionsbereich des gesamten Systems.

Anhand dieser Regeln kann man die Folgen partieller Steroidbiosynthesedefizienzen für die späteren Fertilitätsstörungen erklären. Aufgrund der spezifischen Situation während der sexuellen Entwicklungsphasen des Feten sollten sich negative Einflüsse auf die Gonadenentwicklung und damit auf die spätere Spermatogenese pränatal am stärksten auswirken.

Wie Dörner und Mitarbeiter (Stahl et al. 1978, Dörner et al. 1983, Stahl et al. 1984, Hinz & Dörner 1986) an Ratten nachweisen konnten, wirkt sich pränataler Streß der Muttertiere negativ auf die Testosteronsynthese im fetalen und neonatalen Hoden aus. Dies ist durch einen streßbedingten Katecholaminanstieg im mütterlichen Organismus, welcher zu Gefäßverengungen in der Plazenta führt, möglich. Der resultierende Sauerstoffmangel des Feten verursacht bei diesem wiederum Streß (Rohde et al. 1989), der durch vermehrte CRH-Ausschüttung mit der Aktivierung von Hypophyse und NNR einhergeht.

Unterliegt die Mutter eines Feten mit partieller 21-OH- oder 3 β -HSD-Defizienzen außergewöhnlichen Streßsituationen, ist es wahrscheinlich, daß durch die resultierende zusätzliche Stimulation der NNR-Androgenausschüttung die Folgen des Enzymdefektes an Stärke zunehmen. Es ist sogar zu erwägen, daß sich Symptome bei Heterozygoten überhaupt erst durch zusätzliche Einflüsse wie Streß oder andere Umweltfaktoren manifestieren.

Wie bei PCOS hat auch die Frequenz der idiopathischen Oligospermie innerhalb der letzten Jahrzehnte deutlich zugenommen (Dörner, 1998, Dörner, 2000). Es ist anzunehmen, daß die gleichen vermutlich den Anstieg der Prävalenz des PCOS verursachenden „endocrine disruptors“ - insbesondere DDT - auch bei der idiopathischen Oligospermie in der Fetalperiode teratogenetisch wirksam waren.

Zusammenfassung

Ziel der Untersuchungen war, zur Klärung der Ursachen einer während der letzten Jahrzehnte erhöhten Frequenz sowohl von PCOS als auch von IO beizutragen. Es war zu ermitteln, ob hormonelle Verschiebungen bei den Patienten nachweisbar und diese durch genetische und epigenetische Faktoren erklärbar sind.

Ausgehend von dem Postulat, daß verminderte 21-OH- und 3 β -HSD-Aktivitäten als prädisponierende Faktoren von PCOS und IO angesehen werden, waren hormonanalytische Untersuchungen zur Ermittlung partieller 21-OH- bzw. 3 β -HSD-Defizienzen durchgeführt worden.

Den eigenen Erfahrungen und Darstellungen der internationalen Literatur entsprechend befaßt sich ein Teil der Methodik mit der Entwicklung einer neuen, der üblichen 17 α -OHP-Messung überlegenen Methode zur Ermittlung von 21-OH-Defizienzen durch 21-DOF-Bestimmung nach ACTH-Test im Blutplasma.

Wir erhielten bei vier von 21 PCOS-Patientinnen und drei von acht Patienten mit IO erhöhte 21-DOF-, 21-DOF/F- bzw. 17 α -OHP-Werte nach ACTH-Test, die auf partielle 21-OH-Defizienzen hinweisen. Zusätzlich wurden bei 12 PCOS-Patientinnen erhöhte basale DHEAS- oder DHEAS/F-Werte gefunden, die als Hinweise auf partielle 3 β -HSD-Defizienzen oder 17,20-Lyase-Hyperaktivität gedeutet wurden. In der Stichprobe der IO waren DHEAS oder DHEAS/F-Werte bei vier Patienten erhöht. Da bei vier der 12 Patientinnen mit PCOS und zwei von vier Patienten mit IO genetisch und endokrinologisch gleichzeitig eine partielle 21-OH-Defizienz nachgewiesen wurde, kann bei diesen Patienten eine partielle 3 β -HSD-Defizienz weitgehend ausgeschlossen werden.

Es wurden molekulargenetische Untersuchungen für die 14 häufigsten Mutationen im *CYP21* bei Cohorten mit AGS, PCOS und IO durchgeführt.

Die Untersuchung der AGS-Patienten sollte dazu dienen, ein effizientes und schnelles System der Mutationssuche für diagnostische Zwecke zu etablieren. Es wurden die häufigsten, phänotypisch wirksamen Mutationen im *CYP21* bei der Mehrzahl dieser Patientengruppe im homozygoten bzw. compound heterozygoten Zustand gefunden und eine deutliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation festgestellt.

Auch bei Patientinnen mit PCOS sowie bei IO, bei denen partielle 21-OH-Defizienzen nachweisbar waren, wurden Mutationen im *CYP21* gefunden. Die hierbei heterozygot vorliegenden Mutationen waren dieselben, die homozygot oder compound heterozygot bei schweren Formen des AGS gefunden wurden. Es ergab sich eine Korrelation molekulargenetischer und hormonanalytischer Befunde bei AGS, PCOS sowie IO.

Allerdings konnten bei der Mehrzahl der Fälle mit PCOS und mit IO weder Mutationen noch hormonelle Auffälligkeiten hinsichtlich partieller 21-OH-Defizienzen gefunden werden. Die jedoch bei vielen Patientinnen gefundenen erhöhten DHEAS- und DHEAS/F-Werte stimmen mit Untersuchungen überein, die parallel starke Zunahmen der Häufigkeit der Hemmung des Enzyms 3 β -HSD bzw. der Aktivierung der 17,20-Lyase bei PCOS-Patientinnen und der Prävalenz des PCOS selbst bei nach 1955 geborenen Frauen und von Spermatogenesestörungen bei nach 1960 geborenen Männern fanden. Die Ursache hierfür wird in der Beeinflussung der adrenalen und gonadalen Steroidhormonsynthese vor allem durch das Umweltteratogen DDT und seine Metaboliten gesehen. Weiterhin wurde der Umweltfaktor Streß diskutiert. Für die Ätiopathogenese der untersuchten Fertilitätsstörungen werden materno-fetale Mechanismen postuliert, worauf unsere sowohl molekulargenetischen als auch hormonanalytischen Befunde hinweisen.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse unserer Arbeit die These, daß Leben auf der Interaktion von Genen und Umweltfaktoren beruht und daß Hormone dabei

als Mediatoren wirken.

In gen- oder umweltbedingten unphysiologischen Konzentrationen können sie während kritischer Entwicklungsphasen des neuroendokrinen Systems als Teratogene wirken und zu lebenslangen Reproduktionsstörungen führen.

Literaturverzeichnis

- Adams J, Polson FS & Franks S (1986) Prevalence of polycystic ovaries in woman with anovulation and ideopathic hirsutism. *Br. Med. J.* 293: 355-359.
- Aiman J & Boyar RM (1982) Testicular function in transsexual men. *Arch. Sex. Behav.* 11:171-179
- Amor M, Parker KL, Globberman H, New MI & White PC (1988) Mutation in the CYP21 gene (ile-172-to-asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85: 1600-1604
- Azziz R, Black V, Hines GA, Joy LM & Roots RL (1998) Adrenal androgen excess in the polycystic ovary syndrome: sensitivity and responsivity of the hypothalamic – pituitary –adrenal axis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 2317-2323
- Azziz R & Owerbach D (1995) Molecular abnormalities of the 21-hydroxylase gene in hyperandrogenic women with an exaggerated 17-hydroxyprogesterone response to short-term adrenal stimulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172: 914-918.
- Bachega TASS, Bliierbeck AEC, Madureira G, Marcondes JAM & Longui CA (1998) Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocr. Metab.* 83: 4416-4419.
- Baltimore D (1981) Gene conversion: Some implications for immunoglobulin genes. *Cell* 63: 851.
- Barnes RB, Rosenfield RL, Ehrmann DA, Cara JF, Cuttler L, Levitsky LL & Rosenthal IM (1994) Ovarian hyperandrogenism as a result of congenital adrenal virilizing disorders: Evidence for perinatal masculinization of neuroendocrine function in woman. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79:1328-1333.
- Binoux M, Pham-Huu-Trung MT, Courmelen M, Girard F & Ganlobre P (1972) Plasma ACTH in adrenogenital syndrome. *Acta Paediatr. Scand.* 61: 269.
- Björntop P (1996) The android woman risky condition. *J. Internat. Med.* 239: 105-110.
- Bongiovanni AM (1983) The response of several adrenocortical steroids to the administration of ACTH in hirsute women. *J. Steroid. Biochem.* 18: 745-747.
- Bongiovanni AM, Eberlein WR, Smith JD & McPadden AJ (1959) The urinary excretion of three C-21 methyl corticosteroids in the adrenogenital syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 19: 1608-1618.
- Bongiovanni AM (1961) Unusual steroid pattern in congenital adrenal hyperplasia: deficiency of 3 β -hydroxydehydrogenase. *J. Clin. Endocrinal. Metab.* 21: 860-862.
- Bradbury JT & Salte WG (1955) Aberrant adrenal function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 15: 1291-1299.
- Braun L, Schneider PM, Giles CM, Bertrams J & Rittner C (1990) Null alleles of human complement C4. *J. Exp. Med.* 171:129.
- Breckwoldt M & Geisthövel (1984) Endocrinological and sonographic data in normal and insufficient cycles. In Taubert HD, Kuhl H: *The Inadequate Luteal Phase*. MTP Press, Lancaster: 103-109.
- Bricaire H, Luton JP, Guilhaume B & Laudat MH (1979) Adrenal hyperandrogenism due to enzyme disturbance of late onset (autor's transl). *Nouv. Presse Med.* 8: 2663-2668.
- Brunelli VL, Carrera P, Monneret MP, Asencio MJ, Spiga I, Russo G, Chiumello G, Ferrari M & Forest MG (1994) 21-deoxycortisol (21-DOF) plasma levels after ACTH stimulation and molecular characterization of Italian families with classis P450c21 deficiency: a comparative study, abstr. Of the 33rd Ann. Meeting of the ESPE, Maastricht June 22-25, *Horm. Res.* 47: 110.

- Carrera P, Bordone L, Azzani T, Brunelli V, Garancini MP, Chiumello G & Ferrari M (1996) Point mutations in Italian patients with classic, non-classic, and cryptic forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum. Genet.* 98: 662-665.
- Cassorla F, Tenore A, Parks JS, Marino J & Bongiovanni AM (1984) Serum 21-deoxycortisol and 17-hydroxypregnenolone in parents of patients with congenital adrenal hyperplasia. *J. Endocrinol. Invest.* 3: 137-142
- Chiou SH, Hu MC & Chung BC (1990) A missense mutation at Ile172---Asn or Arg356---Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *J. Biol. Chem.* 265 (6): 3549-52.
- Collier S, Sinnott PJ, Dyer PA, Price DA, Harris R & Strachan T (1989) Pulsed field gel electrophoresis identifies a high degree of variability in the number of tandem 21-hydroxylase and complement C4 gene repeats in 21-hydroxylase deficiency haplotypes. *EMBO. J.* 8: 1393-1402.
- Collier S, Tassabehji M & Strachan T (1993) A de novo pathological point mutation at the 21-hydroxylase locus: implications for gene conversion in the human genome. *Nat. Genet.* 3: 260.
- Cooke HJ & Elliott DJ (1997) RNA-binding proteins and human male infertility. *Trends. Genet.* 13: 87-89.
- Cowan LD (1981) Breast cancer incidence in women with a history of progesterone deficiency. *Am J. Epidemiol.* 114: 609-613
- Cravioto MD, Ulloa-Aguirre A, Bermudez JA, Herrera J, Lisker R, Mendez JP & Perez-Palacios G (1986) A new inherited variant of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase deficiency syndrome: evidence for the existence of two isoenzymes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63 (2): 360-367.
- De Crecchio L (1865) Sopra un caso di apparenza virile in una donna. *Morgagni* 7: 1951.
- Dunaif A, Green G, Futterweit W & Dobrjansky A (1990) Suppression of hyperandrogenism does not improve peripheral or hepatic insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70 (3): 699-704.
- Dolzan V, Prezelj J, Vidan-jeras B & Breskvar K (1999) Adrenal 21-hydroxylase gene mutations in Slovenian hyperandrogenic women: evaluation of corticotrophin stimulation and HLA polymorphisms in screening for carrier status. *European. J. of Endocrinology* 141: 132-139
- Dörner G & Hinz G (1971) Männlicher Hypogonadismus mit sekundärer Hyposexualität nach hochdosierten Gaben von Oestrogenen während der hypothalamischen Differenzierungsphase. *Endokrinologie* 58: 227-233.
- Dörner G, Stahl F, Rohde W & Schnorr D (1975) An apparently direct inhibitory effect of estrogen on the human testis. *Endokrinologie* 66: 221-224.
- Dörner G (1976) *Hormones and Brain Differentiation*. Amsterdam and New York, Elsevier Scientific Publishing Company.
- Dörner G (1980) Die Ontogenese des neuroendokrinen Systems als kinetischer Prozeß. *Nova Acta Leopoldina NF* 51: 279-291.
- Dörner G (1980) Sexual differentiation of the brain. *Vitamins and hormones*: 325-381.
- Dörner G, Schenk B, Schiedel B & Ahrens L (1983) Stressful events in prenatal life of bi- and homosexual men. *Exp. Clin. Endocrinol.* 81: 83-87.
- Dörner G (1989) Hormone-dependent brain development and neuroendocrine prophylaxis. *Exp. Clin. Endocrinol.* 94: 4-22.
- Dörner G (1990) Die Bedeutung der hormonabhängigen Gehirnentwicklung für die Humanethologie. *Nova acta Leopoldina NF* 63: 55-66.
- Dörner G (1992) Sex hormone dependent brain organisation, sexual behaviour and

- ovarien function. *New Dev. Bioscience* 6: 67-76.
- Dörner G (1996) Umwelthormone als Ursache lebenslanger Fehlfunktionen. *Humboldt Spektrum* 4: 12-14.
- Dörner G (1998) Environment and gene dependent effects of hormones and neurotransmitters on brain development in mammals. In: Gies A, Wenzel A, Gahr M (eds.) *Effects of endocrine disrupters in the environment on neuronal development and behaviour*. Berlin: Umweltbundesamt 50: 71-85.
- Dörner G, Rohde W, Götz F, Plagemann A, Peters H & Ghanaati Z (2000) Genetic and environmental effects on sexual brain organization mediated by sex hormones. Vortrag auf dem „International Behavioral Development Symposium 2000“, Minot, USA.
- Fiet J, Gueux B, Gourmelen M, Kuttann F, Vexiau P, Couillin P, Pham-Huu-Trung MT, Vilette JM, Raux-Demay MC, Galons H & Julien R (1988) Comparison of basal and adrenocorticotropin-stimulated plasma 21-deoxycortisol and 17-hydroxyprogesterone values as biological markers of late-onset adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 659-667.
- Fiet J, Gueux B, Raux-Demay MC, Kuttann F, Vexiau P, Gourmelen M, Couillin P, Mornet E, Vilette JM, Brerault JL, Galons H, Boudou P, Julien R & Dreux C (1989) 21 desoxycortisol un nouveau marqueur de l'hyperandrogenie surrenalienne par déficit an 21 hydroxylase. *Press Med.* 18: 1965-1969.
- Forest MG, Pugeat M, Monneret MP, Rigaud C, David M & Morel Y (1994) Normative data for the response of plasma 21-deoxycortisol to ACTH stimulation: efficient screening test for heterozygosity of 21-hydroxylase (21-OH) deficiency in the general population. *Horm. Res.* 41: 110.
- Franks S, Gharani N, Waterworth D, Batty S, White D, Williamson & Ganong WF, Alpert LC & Lee TC (1974) ACTH and the regulation of adrenocortical secretion. *N. Engl. J. Med.* 290: 1006-1011.
- Franks S (1989) Polycystic ovary syndrome: a changing perspective. *Clin. Endocrinol.* 31: 87-120.
- Frank-Raue K, Raue F, Korth-Schütz S, Vecsei P & Ziegler R (1989) Klinik und Diagnostik bei Männern mit leichtem 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Mangel. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 114: 331-334.
- Franks S, Mason H, White D & Willis D (1998) Ethiology of anovulation in polycystic ovary syndrome. *Steroids* 63: 306-307.
- Gebert G & Thomas C (1992) *Endokrines System*, Stuttgart-New York, Schattauer.
- Geller DH, Auchus RJ, Mendonca & Miller WL (1997) The genetic and functional basis of isolated 17,20-lyase deficiency. *Nat. Genet.* 17: 201-205.
- Geisthövel F (1998) Obesity in female life – from molecular to clinical aspects. *Zentralbl. –Gynäkol* 120 (5): 223-234
- Ghanaati Z, Peters H, Ventz M, Pfüller B, Müller S, Zend-Ajus E, Rohde W & Dörner G (1999) Endocrinological and genetic findings in patients with Polycystic Ovary syndrome (PCOS) *Neuroendocrinologie Letters* 20: 299-303.
- Ghanaati Z, Rohde W, Ventz M, Ritsch S, Peters H & Dörner G (2000) Endocrinological and genetic studies in patients with idiopathic oligospermia. In Vorbereitung für *European J. of obstet.*
- Ghanaati Z, Rohde W, Ventz M, Pfüller B, Müller S, Peters H & Dörner G (2000) Endocrinological and genetic Studies in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). 12. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik. *Medizinische Genetik* 11: 191.
- Ghanaati Z, Rohde W, Ventz M, Lindner R, Peters H, & Dörner G (2000) Endocrinological

- and genetic studies in patients with Polycystic Ovary syndrome (PCOS)
Posterpräsentation auf dem „International Behavioral Development Symposium
2000“, Minot, USA.
- Gharani N, Waterworth DM, Batty S, White D, Gilling-Smith C, Conway GS, McCarthy M, Franks S & Williamson R (1997) Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Hum. Mol. Genet.* 6: 397-402.
- Globerman H, Amor H, Parker KL, New MI & White PC (1988) A nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Invest.* 82: 139-144.
- Gourmelen M, Gueux B, Pham-Huu-Trung MT, Fiet J & Girard F (1984) Detection of heterozygous carrier for 21-hydroxylase deficiency by plasma 21-deoxycortisol measurement, Satellite Symposium, 7th International Congress of Endocrinology, Congenital Hyperplasia Meeting July 7-9, New York City (Abstract)
- Götz F, Plagemann A, Rohde W, Thieme S, Oehme A & Dörner G (1998) Organising effects of week estrogens and xenoestrogens on generative and behavioral reproductive functions in male and female rats – possible role in the human. In: Sanchez-Franco F, Wass JAH (eds) Abstract of IV. European Congress of Endocrinology. Bioscientifica 3-259
- Gueux B, Fiet J, Pham-Huu-Trung MT, Villette JM, Gourmelen M, Galons H, Brerault JL, Vexiau P & Julien R (1985) Radioimmunoassay for 21-deoxycortisol: clinical application. *Acta. Endocrinol.* 108: 537-544.
- Heinrich U, Milewicz A, Fies A, Vecsei P & Romer T (1984) Further studies on the usefulness of 21-deoxycortisol (21-DOF) prior and after ACTH for the diagnosis, therapy and detection of heterozygosity in families with 21-hydroxylase deficiency (21-OHD). Satellite Symposium, 7th International Congress of Endocrinology, Congenital Hyperplasia Meeting July 7-9, New York City (Abstract)
- Harada F, Kimura A, Iwanaga T, Shimosawa K, Yata J & Sasazuki T (1987) Gene conversion-like events cause steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8091.
- Harada F, Nishimura Y, Suzuki K, Matsumoto H, Oohira T, Matsuda I & Sasazuki T (1987) The patient with combined deficiency of neuraminidase and 21-hydroxylase. *Hum. Genet.* 75 (1): 91-92.
- Helmberg A, Tabarelli M, Fuchs MA, Keller E, Dobler G, Schnegg I, Knorr D, Albert E & Kofler R (1992) Identification of molecular defects causing congenital adrenal hyperplasia by cloning and differential hybridization of polymerase chain reaction-amplified 21-hydroxylase (CYP21) genes. *DNA and Cell Biology* 11: 359-368.
- Helmberg A (1995) Twin genes and endocrine disease: CYP21 and CYP21 genes. *Acta. Endocrinol.* 129: 97-108.
- Higashi Y, Hirusama T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T & Ohura T (1991) Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J. Biochem. (Tokyo)* 109: 638-644.
- Higaschi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T & Ohura T (1991) Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J. Biochem. (Tokyo)* 109: 638-644.
- Hinrichsen KV (1990) Humanembryologie, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokio-Hongkong-Barcelona, Springer.
- Hinz G & Dörner G (1986) Die Bedeutung von Hormonen für die geschlechtsspezifische Gehirndifferenzierung und die Teratopsychophysiogenese. *Z. Psychol.* 194: 293-309.

- Hohlweg J (1966) Die medikamentöse Therapie der Fertilitätsstörungen des Mannes in der medizinischen Literatur von 1949-1964, Dissertation an der Medizinischen fakultät der Universität Hamburg.
- Hoeller WS, Scholz D, Binlingmaier F, Keller E & Ekkehard (1985) Genetic differences between the salt-wasting, simple virilizing and nonclassical types of congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* 60: 757-763.
- Hull MG (1987) Epidemiology of infertility and polycystic ovarian disease: endocrinological and demographic studies. *Gynecol. Endocrinol.* 1: 235-245.
- Jeferies WM, Weir DR, Weir DR & Prouty RL (1958) The use of cortisone related steroids in infertility. *Fertil. Steril.* 9: 145.
- Jospe N, Donohoue PA, Dop Cv, McLean RH, Bias W & Migoen CJ (1987) Prevalence of polymorphic 21-hydroxylase gene (CA21HB) mutations in salt losing congenital adrenal hyperplasia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142: 798-804.
- Jones HW & Jones GES (1954) The gynecological aspect of adrenal hyperplasia and allied discrinological and demographic studies. *Gynecol. Endocrinol.* 1: 235-245.
- Jeferies WM, Weir DR, Weir DR & Prouty RL (1958) The use of cortisone related steroids in infertility. *Fertil. Steril.* 9: 145.
- Jospe N, Donohoue PA, Dop Cv, McLean RH, Bias W & Migoen CJ (1987) Prevalence of polymorphic 21-hydroxylase gene (CA21HB) mutations in salt losing congenital adrenal hyperplasia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142: 798-804.
- Jones HW & Jones GES (1954) The gynecological aspect of adrenal hyperplasia and allied disorders. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 68: 1330.
- Kapelari K, Ghanaati Z, Wollmann H, Ventz M, Ranke MB, Kofler R & Peters H (1999) A rapid screening for steroid 21-hydroxylase mutations in patients with congenital adrenal hyperplasia. *Hum. Mut.* 13: 505.
- Keck C, Neulen J & Breckwoldt M (1997) Endokrinologie Reproduktionsmedizin Andrologie (Praxis der Frauenheilkunde Band 1). Georg Thieme Verlag, 55-58.
- Kohn B, Levine LS, Pollak MS, Pang S, Lorenzen F, Levy D, Lerner AJ, Rondanini GF & Dupont B (1982)
- Kobayashi H, O'hUigin C & Klein J (1992) Evolutionary origin of mutations in the primate cytochrome P45021 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 766-780.
- Krause W (1991) Idiopathische Spermatogenesestörungen, In: Krause W, Rothauge CF: Andrologie, Stuttgart, Enke.
- Labhart A (1978) Klinik der inneren Sekretion. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 360.
- Labrie F (1991) Intracrinology. *Mol. Cell. Endocrinol.* 78(3): C113-118.
- Lachance Y, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Dumont M, de Lauoit Y, Guérin S, Leblanc G & Labrie F (1990) Characterization of human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase (3 β -HSD) gene and expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 265: 20469-20475.
- Lako M, Ramsden S, Cambpell RD & Strachan T (1999) Mutation screening in British 21-hydroxylase deficiency fam and development of novel microsatellite based approaches to prenatal diagnosis *J. Med. Genet.* 36(2): 119-24.
- Lanzone A, Fulghesu AM, Cucinelli F, Guido M, Pavone V, Caruso A & Mancuso S (1996) Preconceptional and gestational evalution of insulin secretion in patients with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 11(11): 2382-2386.
- Laron Z, Pollack MS, Zamir R, Roitman A, Dickerman Z, Levine LS, Lorenzen F, O'Neill GJ, Pang S & New MI (1980) Late onset 21-hydroxylase deficiency and HLA in

- the Ashkenazi population: A new allele at the 21-hydroxylase locus. *Hum. Immunol.* 1: 55-66.
- Laron Z, Roitman A, Pertzelan A, Kaufman H & Zamir R (1985) HLA associations in late-onset 21-hydroxylase deficiency in Israel, in: New, M.I. (ed.): Congenital adrenal hyperplasia, *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York 458: 52-63.
- Lee PA & Gareis FJ (1975) Evidence for partial 21-hydroxylase deficiency among heterozygote carriers of congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41: 415-421.
- Lee PA, Rosenwaks Z, Urban MD, Migeon CJ & Bias WD (1982) Attenuated forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55: 866-871.
- Leidenberger A & Freimut L (1992) *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. Springer Verlag: 259-261.
- Levine LS (1985) HLA-B14 and nonclassical 21-hydroxylase deficiency in a heterogeneous New York population, in: New MI (ed.): congenital adrenal hyperplasia, *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York 458: 65-69.
- Levine A, Benjamin F, Deutsch F & Setzer VL (1988) Comparison of the adrenocorticotrophic hormone stimulation test with and without prior dexamethasone suppression in the diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Fertil. Steril.* 50: 170-172.
- Levo A & Partanen J (1997) Mutation-haplotype analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency in Finland. Implications for the population history of defective alleles. *Hum. Genet.* 99: 488-497.
- Lichter P, Cremer C, Borden J, Manuelides L & Ward DC (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA-libraries. *Hum. Genet.* 80: 224-234.
- Lindner R (1995) Untersuchungen zur Bedeutung partieller 21-Hydroxylase- und 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenasedefizienzen für die Ätiogenese von Formen psychischer Intersexualität. Dissertationsschrift, an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I Biologisches Institut der Humboldt-Universität zu Berlin.
- Lindgren (1958) zit. nach E. Passarge (1994) *Taschenatlas der Genetik*, George Thieme Verlag Stuttgart
- Mantzoros CS, Moschos S, Avramopoulos I, Kaklamani V, Liolios A & Doulgerakis DE (1997) Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor-alpha system in human. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (10): 3408-3413.
- Medvei VC (1982) *A History of endocrinologie*. MTP Press Limited, Lancaster.
- Miller SA, Dykes DD & Polesky HF (1987) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids. Res.* 16: 1988.
- Mendonza BB, Russel AJ, Vosconcelos-Leit M, Arnhold IJP, Bloise W, Wajchenberg BL, Nicolau W, Sutcliffe RG & Wallace AM (1993) Mutation in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II associated with pseudohermaphroditism in males and premature pubarche or cryptic expression in females. *J. Mol. Endocrinol.* 12: 119-122.
- Milewicz A, Vecsei P, Korth-Schütz S, Haack D, Rösler A, Lichtwald K, Lewicka S & Mittelstaedt GV (1984) Development of plasma 21-deoxycortisol radioimmunoassay and application to the diagnosis of patient with 21-hydroxylase-deficiency. *J. Steroid Biochem.* 21: 184-191.

- Milewicz A & Medras M (1987) 21-deoxycortisol (21-DOF) and 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) responses to adrenalcorticotropin in males with idiopathic oligozoospermia. *Andrologia* 19: 393-397.
- Mornet E, Crete P, Kuttann F, Raux-Demay MC, Boue J, White PC & Boue A (1991) Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 79-88.
- Morel Y, André J, Uring-Lambert B, Hauptmann G, Bétuel H, Tossi M, Forest MG, David M, Bertrand J & Miller WL (1989) Rearrangements and point mutations of p450c21 genes are distinguished by five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Invest.* 83: 527-536.
- Morel Y, Bristow J, Gitelman SE & Miller W (1989) Transcript encoded on the opposite strand of the human steroid 21-hydroxylase/complement component C4 gene locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6582-6586.
- Morris RS & Gleicher N (1996) Genetics abnormalities, male infertility and ICSI. *Lancet* 347: 1277-1279.
- Mulrow PJ & Ganong WF (1962) The nature of the aldosterone-stimulating factor in dog kidneys. *J. Clin. Invest.* 41: 505-518.
- New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Krohn B, Oberfield SE, Pollack MS, Dupont B, Stoner E, Levy DJ, Pang S & Levine LS (1983) Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57: 320-326.
- New MI & Levine LS (1984) Recent advances in 21-hydroxylase deficiency. *Ann. Rev. Med.* 35: 649-663.
- New MI (1992) Late-onset steroid 21-hydroxylase deficiency: a variant of classical CAH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55: 817-827.
- Nieschlag E (1992) Diagnostik von Potenz- und Fertilitätsstörungen des Mannes, in: Heck, A: Störungen der Sexualfunktion und Fertilität-Diagnostik und Therapie-, *Akt. Endokr.* 13: 120-123.
- Nowakowski H & Püschel L (1952) Das isosexuelle adreno-genital Syndrom mit Nebennierenrinden-Hyperplasia beim erwachsenen Mann. *Acta. Endocrinol.* 11320-11344.
- Ohlsson G & Schwartz M (1997) Mutations in the gene encoding 21-hydroxylase detected by solid-phase minisequencing. *Hum. Genet.* 99: 98-102.
- Ohlsson G, Müller J, Skakebaek NE & Schwartz M (1999) Steroid 21-hydroxylase deficiency: Mutational spectrum in Denmark, three novel mutations, and in vitro expression analysis. *Hum. Genet.* 103: 482-486.
- Ojeifo JO, Winters SJ & Troen P (1984) Basal and adrenocorticotropin hormone-stimulated serum 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency with normal glomerulosa function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59: 808-818.
- Owerbach D, Crawford YM & Draznin MB (1990) Direct Analysis of CYP21B Genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification. *Mol. Endo.* 4: 125-131.
- Owerbach D, Ballard AL & Draznin MB (1992) Salt-wasting congenital adrenal hyperplasia: detection and characterization of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene, CYP21, using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74: 553-559.
- Pang S, Levine SL, Stoner E, Opitz JM, Pollack MS, Dupont B & New MI (1983) Nonsalt-losing congenital adrenal hyperplasia due to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency with normal glomerulosa function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56: 808-818.

- Pang S, Lerner AJ, Stoner E, Levine LS, Oberfield SE, Engel I & New MI (1985) Late-onset adrenal steroid 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. I. A cause of hirsutism in pubertal and postpubertal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60: 428-439.
- Pinkel S, Helminen P, Saarinen UM, Alitalo R & Peltonen L (1988) Cytogenetic analysis using quantitative high-sensitivity fluorescence hybridisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2934-2938.
- Pollard i & Dyer (1985) Effect of stress administered during pregnancy on the development of fetal testes and their subsequent function in adult rat. *J. Endocr.* 107: 241-245
- Polson DW, Wadsworth J & Adams J (1988) Polycystic ovaries common finding in normal women. *Lancet.* 1: 870-872.
- Prader A, Anders G & Habich H (1962) Zur Genetik des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms. *Helv. Paediatr. Acta* 13: 426-428.
- Prader A (1958) Die Häufigkeit des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms. *Helv. Paediatr. Acta* 13: 426-428.
- Pschyrembel W (1990) *Klinisches Wörterbuch*, Berlin-New York, de Gruyter.
- Reinwein D & Benker G (1992) *Klinische Endokrinologie und Diabetologie*, Stuttgart-New York, Schattauer.
- Ritsch S (1995) Die Bedeutung von 21-Hydroxylase- und 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Defizienzen für die Ätiopathogenese von Spermiogenesestörungen beim Mann. Dissertationsschrift. Institut für Experimentelle Endokrinologie des Universitätsklinikums Charité-Berlin.
- Rodrigues NR, Dunham I, Yu CY, Carrol MC, Porter RR & Cambell R (1987) Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO. J.* 6: 1653-1661.
- Rohde W, Ohkawa T, Götz F, Stahl F, Tönjes R, Aral K & Dörner G (1989) Influence of prenatal stress on the fetal neuroendocrine system in rats. I. Acute effects on hypothalamic neurotransmitters, neurohormones, opioids and systemic hormone levels. In: *Stress, Neurochemical and Humoral Mechanisms 1*, Proc. 4. Intern. Symp. On Catecholamines and other Neurotransmitters in Stress. Edited by Van Loon GR, Kvetnansky R, McCarty R and Axelrod J. By Gordon & Breach Science Publ. New York USA, 285-298.
- Rosenwaks Z, Lee PA, Jones GS, Migeon CJ & Wentz AC (1979) An attenuated form of congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49: 335-337.
- Rumsby G, Honour JW & Rodeck C (1993) Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia by direct detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. *Clin. Endocrinol.* 38: 421-425.
- Russel AJ, Wallace AM, Forest MG, Donaldson MDC, Edwards CRW & Sutcliffe RG (1994) Mutation in the human gene for 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II leading to male pseudohermaphroditism without salt loss. *J. Mol. Endocrinol.* 12: 225-237.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger F, Niklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Schmidt-Matthiesen Hepp (1998) *Gynaekologie und Geburtshilfe*. Schattauer Verlag. 65-68.
- Schirren C, Leidenberger F & Stoll P (1980) *Die kinderlose Ehe*, Köln-Löwenich, Deutscher Ärzte-Verlag.

- Schneider G, Genet M, Bongiovanni AM, Goldmann AS & Rosenfield RL (1975) Persistent testicular delta 5-isomerase-3 β -hydroxysteroiddehydrogenase (delta5-3 β -HSD) deficiency in the delta-3 β -HSD form of congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Invest.* 55: 681-683.
- Schulze E (1997) Molekulargenetische Diagnostik und Pränataltherapie beim adrenogenitalen Syndrom. Vortrag: Deutsche Gesellschaft für angewandte Endokrinologie, Jahrestagung. Berlin
- Simard J, Rhéaumé E, Sanchez R, Laflamme N, DE Launiot Y, Luu-The V, van Seters AP, Gordon RD, Bettendorf M, Heinrich U, Moshang T, New MI & Labrie F (1993) Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Mol. Endocrinol.* 7: 1-12.
- Simard J, Rhéaumé E, Leblanc JF, Simon W, Joplin GF, Gilbey ST, Allenson J, Mettler G, Bettendorf M, Heinrich U & Labrie F (1994) Congenital adrenal hyperplasia caused by a novel homozygous frameshift ,mutation 273 delta AA in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene (HSD3B2) in three male patients of Afghan/Pakistani origin. *Hum. Mol. Gen.* 3: 327-330.
- Sorge J, Gross E, West C & Beutler E (1990) High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease. *J. Clin. Invest.* 86: 1137-1143.
- Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A & New MI (1985) High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 37: 650-667.
- Speiser PW, New MI & White PC (1988) Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14, DR1. *New Eng. J. Med.* 319: 19-23.
- Speiser PW, New MI & White PC (1989) Clinical and genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency. *Endocr. Res.* 15: 257-276.
- Speiser PW, Laforgia N, Kato K, Pareira J, Khan R, Yang S Y, Whrwood C, White PC, Elias S, Schriock E, Simpson JL, Taslimi M, Najjar J, May S, Mills G, Crawford C & New MI (1990) First trimester prenatal treatment and molecular genetic diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-Hydroxylase deficiency). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70: 838-848.
- Stahl F, Götz F, Poppe I, Amendt P & Dörner G (1978) Pre- and early postnatal testosterone levels in rat and human. In: Dörner G, Kawakami M (Eds.): *Hormones and Brain Development, Developments in Endocrinology 3*, Amsterdam New-York-Oxford, Elsevier/North-Holland biomedical Press. 99-109.
- Stahl F, Götz F & Dörner G (1984) Plasma testosterone levels in rats under various conditions. *Exp. Clin. Endocrinol.* 84: 277-284.
- Stanhope R, Adams J & Brook CG (1988) Evolution of polycystic ovaries in a girl with delayed menarche. A case report. *J-Reprod-Med.* 33 (5):482-4.
- Stein IF & Leventhal ML (1935) Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am. J. Obstet. Gynec.* 29: 181-191.
- Strumberg D, Hauffa BP, Hosthemke B & Grosse-Wilde H (1992) Molecular detection of genetic defects in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: a study of 27 families. *Eur. J. Pediatr.* 151: 821-826.
- Syndor KL, Kelley VC, Raile RB, Ely RS & Sayers G (1953) Blood adrenocorticotropin in children with congenital adrenal hyperplasia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82: 695.
- Talbot JA, Bicknell EJ, Rajkhowa M, Krook A, O'Rahilly S & Clayton RN (1996) Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycystic ovarian syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1979-1983.

- Tapaneinen J, Kellokumpu-Lehtinen P, Pelliniemi L & Huhtaniemi I (1981) Age related changes in endogenous steroids of human fetal testis during early and midpregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52: 98-102.
- Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dumic M, New MI & White PC (1991) A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol. Endocrinol.* 5: 685-692.
- Urabe K, Kimura A, Harada F, Iwagana T & Sasazuki T (1990) Gene conversion in steroid 21-hydroxylase genes. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 1178.
- Ventz M, Peters H, Pfeiffer L, Kofler R, Dörner G & Knappe G (1995) Clinical and molecular genetic findings in patients with the congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Eur. J. Endocrinol.* 130: 29-32.
- Vogel & Motulski AG (1986) *Human Genetics: Problems and Approaches*, 2nd edition, Springer, Berlin.
- Vogt PH, Edelmann A, Hirschmann P & Kohler MR (1995) The azoospermia factor (AZF) of the human Y chromosome in Yq11: function and analysis in spermatogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 685-693.
- Vogt PH, Edelmann A & Kirsch S (1996) Human y chromosome azoospermia factor (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.* 5: 933-943.
- Watson AM, Poloyac SM, Howard G & Blouin RA (1997) Effect of leptin on cytochrome P-450, conjugation, and antioxidant enzymes in the ob/ob mouse. *Drug. Metab. Dispos.* 27: 695-700.
- Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, Stengler B & Luthman H (1994) Mutational spectrum of the 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 1145-1152.
- Weil J, Bidlingmaier F, Sippell WG, Butenandt O & Knorr D (1979) Comparison of two tests for heterozygosity in congenital adrenal hyperplasia (CAH), *Acta. Endocrinol.* 91: 109-121.
- White PC, Chaplin DD, Weis JH, Dupont B, New MI & Seidman JG (1984) Two steroid 21-hydroxylase genes are located in the murine S region. *Nat. Gen.* 312: 465-467.
- White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B & Strominger JL (1985) Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1089-1093.
- White PC, New MI & Dupont B (1986) Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 83: 5111-5115.
- White PC, Vitek A, Dupont B & New MI (1988) Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4436-4440.
- White PC, Dupont J, New MI, Leiberman E, Hochberg Z & Rösler A (1991) A mutation in CYP11B1 (Arg448 to His) associated with steroid 11 β -hydroxylase deficiency. *J. Clin. Invest.* 87: 1664-7.
- White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ & Dean M (1992) Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 12: 301.
- White PC, Tusie-Luna MT, New MI & Speiser PW (1994) Mutations in steroid 21-hydroxylase (CYP21). *Hum. Mut.* 3: 373-378.
- Wichmann U (1981) *Konzentration der androgenen Steroide im Blut bei verschiedenen Funktionszuständen von Hoden und Nebennierenrinde*. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

- Wilson TE, Mouw AR, Weaver CA, Milbrandt J & Parker K (1993) The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. *Moll. Cell. Biol.* 13: 861-868.
- Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC & New MI (1995) Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 2322-2329.
- Winkler JS (1930) zit. nach E. Passarge (1994) Taschenatlas der Genetik, George Thieme Verlag Stuttgart.
- Witchel SF, Bhamidipati DK, Hoffman EP & Cohen JB (1998) Phenotypic heterogeneity associated with the splicing mutation in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocr. Metab.* 81: 4081-4088.
- Witkowski R, Prokop O & Ullrich E (1991) Wörterbuch für die genetische Familienberatung. Akademie Verlag, Berlin.
- Yen SSC (1980) The polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol.* 12: 177-208.
- Young J, Couzinet B, Pholsena M, Nahoul K, Labrie F & Schaison G (1994) Plasma 3 β -hydroxy-delta5-steroids in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 299-304.
- Zachmann M & Prader A (1978) Unusual heterozygotes of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency confirmed by HLA tissue typing. *Acta. Endocrinol.* 92: 542-547.
- Zerah M, Schram P & New MI (1991) The diagnosis and treatment of nonclassical 3 β -HSD deficiency. *Endocrinologist* 1: 75-81.
- Zerah M, Rheaume E, Mani P, Schram P, Simard J, Labrie F & New MI (1994) No evidence of mutations in the genes for type I and type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3 beta HSD) in nonclassical 3 beta HSD deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (6): 1811-1817.
- Zimran A, Sorge J, Gross E, Kubitz M, West C & Beutler E (1990) A glucocerebrosidase fusion gene in Gaucher disease: implications for the molecular anatomy, pathology, and diagnosis of this disorder. *J. Clin. Invest.* 85: 219-222.

Anhang: Materialien**Benötigte Nährmedien und Lösungspuffer für Southern Blot Analyse**

Alle Nährmedien und Puffer wurden mit Aqua dest. angesetzt und anschließend autoklaviert oder steril filtriert. Die Werte sind pro 1000 ml angegeben, wenn nicht anders angegeben.

Alkalischer Lösungspuffer:	50 mM NaOH 1 mM EDTA
Alkalische SDS-Lösung:	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS
Dehybridisierungslösung:	0,5 % SDS
Denaturierungspuffer:	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
ESP-Lösung:	0,5 M EDTA, auf pH 8,0 eingestellt 1 % (w/v) N-Lauroylsarkosin 2 mg/ml Proteinnase K (Boehringer)
Ethidiumbromidlösung:	10 mg/ml in Aqua dem.
Gelladepuffer	0,32 % Bromphenolblau 25 % Ficoll
GET-Lösung (pH 7,6):	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl 25 mM EDTA
Heringssperma-DNA (HS)	in H ₂ O ad 10 mg/ml, durch Ultraschall auf durchschnittlich 500 bp zerkleinert
High-Salt-Lösung:	3 M Kaliumacetat 1,8 M Ameisensäure
Hybridisierungslösung I:	5 x Denhardts 5 x SSC 0,5 % SDS 7 % Dextransulfat 100 µg/ml HS
Hybridisierungslösung II:	7 % SDS 1 mM EDTA Dinatriumsalz 1 % BSA 0,5 M Natrium-Phosphat-Lösung ad 1000 ml auf pH 7,2 eingestellt
Hybridisierungswaschlösungen:	I. 2x SSC / 1 mg/ml SDS II. 1xSSC / 1 mg/ml SDS III. 0,2x SSC / 1 mg/ml SDS IV. 0,1xSSC / 1 mg/ml SDS
Lysepuffer:	10 mM Tris-HCl 400 mM NaCl
Neutralisierungslösung:	0,5 M Tris 3 M NaCl mit HCl auf pH 7,0 einstellen
20x SSC:	3 M NaCl 0,3 M tri-Natriumcitrat mit HCl auf pH 7,0 eingestellt
5x TBE-Lösung:	0,5 M Tris

	0,5 M Borsäure 10 mM EDTA Dinatriumsalz
50x TAE-Lösung:	2 M Tris 50 mM EDTA Dinatriumsalz mit Eisessig auf pH 7,5 - 8,0 eingestellt
10x TE-Lösung:	10 mM EDTA Dinatriumsalz 0,1 M Tris-Lösung ad 1000 ml auf pH 7,6 eingestellt
LB-Agar:	500 ml LB-Medium 15 g Agar 500 µl Ampicillin
LB (M)-Medium:	1 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Agar 1 mM MgCl ₂
PBS	150 mM NaCl 10 mM Na ₂ EDTA, pH 8,0
Phenol	ad 0,1 % mit Hydroxychinolin mit 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 äquilibriert
10 x Kinasierungspuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 7,6 0,1 M MgCl ₂ 50 mM DTT 1 mM Spermidin 1 mM EDTA, pH 8
6% Polyacrylamidgel:	42 g Harnstoff (Urea) 10 ml 10 x TBE-Puffer 20 ml 30% Acrylamid ad 100 ml ddH ₂ O auffüllen

Geräte und Zubehör

Hersteller

Brutschrank	Heraeus
Cronex Röntgenkassetten	Du Pont
Eagle Eye II	Stratagene
Elektrische Waage	Sartorius
Elektrophoresekammer	Hybaid
Eppendorfpipetten	Eppendorf
Filmentwicklermaschine	AGFA Curix 60
Filmkassette (20x80cm)	REGO
Gel-Blotting-Papier (GB 002)	Schleicher & Schuell
GelBond PAG film	Biozym
Gelelektrophoresekammer	Hybaid
Gelelektrophoresesystem	Life, Technologie, Gibco BRL
Geltrockner (SGD 2000)	Savant
Glasplatten SA 60	Life Technologies
Heizblock Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf

Hybond -N+ Nylon membrane	Amersham
Hybridisier-Ofen für Hybridisierflaschen	Bachofer
Incubator Shaker Modell G 25	NewBrunswick
LKB 2016 Vacugene Blotting System	Pharmacia
Magnetrührer	Ikamay RET/ Heidolph
Mikrowelle	Mulinex
Monovetten	Sarstedt
pH-Meter	Schott
Pipettenboy (Pipetus akku)	Hirschmann Laborgeräte
Polaroid MP-4 Land Camera	Polaroid
Polaroid 667 Professional Sofortbild-Filme	Polaroid
Röntgenfilm Scientific Imaging Film	Eastman Kodak
Schüttler	Gerhardt
Sequenzierungs-	Life,Technologie,Gibco BRL
Stromversorgungsgerät	Consort / Mains / RFT
Spektralphotometer	Pharmacia Biotech
Sorvall RT 6000 Kühlzentrifuge	Du Pont
Sterilbank Microflow Intermed	STOCO
Thermocycler	Perkin Elmer
Tischzentrifuge	IECMicroMax /Janetzki
Kühlzentrifuge	Jouan GR 412
UV-Lampe (366 nm)	UV-Produkte
UV- Transilluminator (305nm)	STRAtagene
UV-visible Recording Spectrophometer UV-160	Shimadzu
Vidio copy prozessor	Mitsubishi
Wasserbadkammer	GFL

Radioisotope

[α -³³P]-dATP-370 Mbq/ml; 2000 Ci/mmol
 [α -³²P]-dCTP-370 Mbq/ml; 3000 Ci/mmol
 [γ -³³P]-dATP-370 Mbq/ml; 3000 Ci/mmol

Diese radioaktiv markierten Nukleotide wurden in Sequenzierungen, Kinasierung und Hybridisierungen eingesetzt und von der Firma NEN-DuPont BadHomburg) bezogen.

Chemikalien und sonstige Reagenzien

30% Acrylamid /0,8 % Bisacrylamid-Lösung	Roth
Agarose Ultra Pure	Gibco BRL
AgNO ₃	Merck
APS	Merck
Bovine Serum Albumine (BSA)	Biolabs
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform reinst	Merck
Human COT-1 DNA (1 mg/ml)	GibcoBRL
DAPI	Sigma
DMSO	Merck
dNTPs	Promega
EDTA*H ₂ O	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol (abs.)	J.T Baker

Ethidiumbromid	Boehringer, MH
Ficoll 400	Pharmacia,
Formaldehyd	Sigma
Gel Slick	AT Biochem.
Glycerin	Reachim
Harnstoff	Merck
HNO ₃ (65%)	GERMED
Haftsilan A 174	Merck
KCl	Merck
MgCl ₂ -Lsg.	Perkin Elmer
Mineralöl	Sigma
Natriumcarbonat	Merck
PCR-H ₂ O	Braun
PCR-Puffer	Perkin Elmer
Roti-Phenol	Roth
SDS	Serva
Synachten	Ciba Geigy
TEMED	Serva
Tris-Base	Merck
Triton X-100	Serva
TRIO-Thermoblock TB 1	Biometra
Phi 174/Hae III (DNA-Längenmarker)	Promega
Phi 174/Hinf I (DNA-Längenmarker)	Promega
100 bp DNA-Leiter	Gibco BRL
Xylen-Cyanol	Merck
Wasserbäder: GFL, M ³ Lauda, Kötterman	GFL, LAUDA
Whatman-3M-Filterpapier	Whatman
Zellkulturplastik	Greiner Labortechnik

Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Zum Einsatz in Sequenzierungen und PCR-Amplifizierungen des 21-Hydroxylase-Gens wurden synthetische Oligonukleotide (Primer) der Firmen TIB MOLBIOL (Berlin) und Gen Set (Paris) MWG bezogen.

Enzyme und Kits

High Prime DNA Labeling Kit	Boehringer, Mannheim
Klenow-Enzym	Amersham
Sequenase PCR Product	USB
Sequencing Kit	USB
Pepsin	Sigma
RNase A	Boehringer, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Perkin Elmer
Proteinkinase K	Boehringer, Mannheim

Danksagung

Frau Prof. Dr. Regine Witkowski, bis 1999 Direktorin des Institutes Medizinische Genetik der Charité, danke ich herzlich für die Möglichkeit, am Institut arbeiten und diese Arbeit anfertigen zu können. Besonders danke ich ihr für die Überlassung des interessanten und anspruchsvollen Themas dieser Dissertation sowie die wertvollen Anregungen und die freundliche Unterstützung und ihre stete Hilfsbereitschaft während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

Meinem Mentor, Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Günter Dörner, bis 1997 Direktor des Institutes für Experimentelle Endokrinologie der Charité, möchte ich herzlich für die Überlassung des endokrinologischen Teils des Themas sowie für die mir jederzeit erwiesene Hilfe, Beratung, kritische Unterstützung und zahlreiche anregende Diskussionen bei der Anfertigung der Arbeit danken.

Herrn Dr. Hartmut Peters, möchte ich für die besonders konstruktive Zusammenarbeit und stets Hilfsbereitschaft bei der Durchführung und Auswertung meiner Versuche danken.

Wertvolle theoretische Anregungen erhielt ich durch Herrn Prof. Dr. Günther Cobet. Auch danke ich ihm für die Durchsicht meines Manuskriptes.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Rohde, Herrn PD. Dr. Manfred Ventz, Herrn Dr. Rolf Lindner, Frau Dr. Susanne Ritsch, Frau Dr. Betina Pfüller Frau Dr. Gabriele Gossing, Frau Dr. Sigrid Gurr und Frau Renita Weltrich für ihre besonders konstruktive Unterstützung und ihre Zusammenarbeit.

Auch hier nicht genannten Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Endokrinologie danke ich für die Durchführung der Hormonanalytik.

Für die Bereitschaft, andrologische Patienten im Rahmen der durchgeführten Studie zu untersuchen danke ich Herrn Prof. Dr. Engel aus der Hautklinik der Charité.

Mein besonderer Dank gilt Frau Regina Neumann, die mir in der Einarbeitungsphase im Labor und beim Erlernen neuer molekulargenetischen Techniken hilfreich zur Seite stand. Für die freundliche Unterstützung meiner Labortätigkeit möchte ich mich ebenfalls bei allen hier nicht genannten Mitarbeitern des Institutes für Med. Genetik der Charité bedanken. Meine Tätigkeit war durch eine konstruktive und angenehme Zusammenarbeit geprägt.

Für die unermüdliche Unterstützung bei der Chromosomenanalyse bin ich Herrn Dr. Maik Urban zu Dank verpflichtet.

Diese Arbeit wurde durch ein Forschungsstipendium des Frauenforschung-Förderprogrammes des Berliner Senats unterstützt. Dafür besonders herzlichen Dank.

Für ihre liebevolle Unterstützung und Geduld danke ich schließlich ganz besonders meinen Eltern. Sie haben mir immer trotz der großen Entfernung ermutigend zur Seite gestanden.

Erklärung

Hiermit erkläre ich:

- daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe,
- daß weder früher noch gleichzeitig ein Promotionsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- daß mir die geltende Promotionsordnung bekannt ist.

Vorträge

- 1997 Ghanaati, Z.
"Molekulargenetische Untersuchungen des Steroid 21-Hydroxylase-Gens (CYP21) bei PCOS-Patientinnen".
Kolloquium der Gynäkologie, Frauenpoliklinik Universitätsklinikum Charité, Berlin, 10. Oktober 1997
- 1997 Ghanaati Z,
"Polycystic ovary syndrome (PCOS) and CYP21 gene mutation".
8th European Students Congress Berlin 15. Oktober 1997
- 1998 Ghanaati, Z.
"Mutationsscreening des Steroid 21-Hydroxylase-Gens (CYP21) bei Frauen mit Polyzystischem Ovar-Syndrom".
4. Mitteldeutsches Humangenetikertreffen, Universitätsklinikum Charité, Berlin, 24. Oktober. 1998
- 1998 Ghanaati, Z.
"Mutationsscreening des Steroid 21-Hydroxylase-Gens (CYP21) bei Frauen mit Polyzystischem Ovar-Syndrom".
2. Congress of Molekular Medicine, International Congress Center Berlin 6. Mai 1998
- 1999 Ghanaati Z,
"Biochemical and molecular investigation of the steroid 21-hydroxylase (CYP21) gene in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS)".
10th European Students Congress Universitätsklinikum Charité, Berlin 15. Oktober 1999
- 2000 in Vertretung: Dörner G, Rohde W, Götz F, Plagemann A, Peters H & Ghanaati Z
"Genetic and environmental effects on sexual brain organization mediated by sex hormones".
„International Behavioral Development Symposium 2000“ in Minot State University, North Dakota USA, 25. - 27. Mai 2000

Eigene Publikationen und Kongreßbeiträge

- GHANAATI Z, GEWIES SAC, VENTZ M, PFÜLLER B, GURR S, GOSSING G, PETERS H & G DÖRNER (1997)** Polycystic ovary syndrome (PCOS) and *CYP21* gene mutation. 2nd Congress of Molecular Medicine. Abstract book: P 169.
- GHANAATI Z, GEWIES SAC, VENTZ M, PFÜLLER B, GURR S, GOSSING G, PETERS H & G. DÖRNER (1998)** Polycystic ovary syndrome (PCOS), hirsutism and *CYP21* gene mutation. 2nd Congress of Molecular Medicine. Journal of Molecular Medicine 76 (6): 118.
- GHANAATI Z, GEWIES SAC, VENTZ M, PFÜLLER B, GURR S, GOSSING G, PETERS H & G DÖRNER (1998)** Polycystic ovary syndrome (PCOS), hirsutism and *CYP21* gene mutation. 10. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik. Medizinische Genetik 10: 159.
- KAPELARI K, GHANAATI Z, WOLLMANN H, VENTZ M, RANKE MB, KOFLER R & PETERS H (1999)** A rapid screening for steroid 21-hydroxylase mutations in patients with congenital adrenal hyperplasia. Hum. Mut. 13: 505.
- GHANAATI Z, VENTZ M, PFÜLLER B, MÜLLER S, GOSSING G, GURR S, ROHDE W, PETERS H & DÖRNER G (1999)** Biochemical and molecular investigation of the steroid 21-hydroxylase (*CYP21*) gene in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). 10th European Students Congress. Abstract book. MO 09: 169.
- GHANAATI Z, ROHDE W, VENTZ M, PFÜLLER B, MÜLLER S, PETERS H & DÖRNER G (1999)** Mutation screening of the steroid 21-hydroxylase (*CYP21*) gene in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). 11. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik. Medizinische Genetik 11: 191.
- GHANAATI Z, PETERS H, VENTZ M, PFÜLLER B, MÜLLER S, ZEND-AJUSCH E, ROHDE W & DÖRNER G (1999)** Endocrinological and genetic findings in patients with Polycystic Ovary syndrome (PCOS) Neuroendocrinologie Letters 20: 299-303.
- GHANAATI Z, ROHDE W, VENTZ M, PFÜLLER B, MÜLLER S, PETERS H & DÖRNER G (2000)** Endocrinological and genetic Studies in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). 12. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik. Medizinische Genetik 11: 191.
- MÜLLER S, GHANAATI Z, ROHDE W, PETERS H & DÖRNER G (2000)** Endocrinological and genetic Studies in patients with idiopathic oligospermia. 12. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik. Medizinische Genetik 11: 192.
- GHANAATI Z, ROHDE W, PETERS H, RITSCH S, VENTZ M & DÖRNER G (2000)** Endocrinological and genetic studies in patients with idiopathic oligospermia. In Vorbereitung für European J. of obstet.
- DÖRNER G, ROHDE W, GÖTZ F, PLAGEMANN A, PETERS H & GHANAATI Z (2000)** Genetic and environmental effects on sexual brain organization mediated by sex hormones. Vortrag auf dem „International Behavioral Development Symposium 2000“ in Minot State University, North Dakota von 25. - 27. Mai 2000. Abstract book: 26
- GHANAATI Z, ROHDE W, PETERS H, LINDNER R, RITSCH S, VENTZ M & DÖRNER G (2000)** Endocrinological and genetic studies in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) „International Behavioral Development Symposium 2000“ in Minot State University, North Dakota von 25. - 27. Mai 2000. Abstract book: 74
- MÜLLER S, PFÜLLER B, GHANAATI Z, PETERS H, REINHARDT R, ROHDE W & LICHTENEGGER W (2000)** Biochemical and molecular genetic investigations of 21 hydroxylase and *CYP21* gene in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) „European Society of Human Reproduction and Embryology, 16th Annual Meeting“ in Bologna Italien 25. - 28. Juni 2000. Abstract book: 32
- MÜLLER S, ROHDE W, PFÜLLER B, VENTZ M, GHANAATI Z, PETERS H & DÖRNER G (2000)** Biochemical and molecular genetic investigations of 21 hydroxylase and *CYP21* gene in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in Vorbereitung für Journal of Molecular Medicine